



**UNIVALI**  
**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**

**FRANCIELE DE CESARO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES LINFOPROLIFERATIVA E  
CITOTÓXICA DOS EXTRATOS METANÓLICOS E FRAÇÕES DE  
*Ipomoea pes-caprae* E *Vernonia scorpioides***

Itajaí – 2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**FRANCIELE DE CESARO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES LINFOPROLIFERATIVA E**  
**CITOTÓXICA DOS EXTRATOS METANÓLICOS E FRAÇÕES DE**  
***Ipomoea pes-caprae* E *Vernonia scorpioides***

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr. Ednéia Casagrande Bueno

Itajaí, Fevereiro de 2009.

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES LINFOPROLIFERATIVA E  
CITOTÓXICA DOS EXTRATOS METANÓLICOS E FRAÇÕES DE  
*Ipomoea pes-caprae* E *Vernonia scorpioides***

Franciele De Cesaro

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.’

---

Ednéia Casagrande Bueno, Dra.  
Orientador

---

Tânia Mari Bellé Bresolin, Dra.  
Coordenador do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

---

Dra. Ednéia Casagrande Bueno (UNIVALI)  
Presidente

---

Dra. Tânia Silvia Fröde (UFSC)  
Membro externo

---

Dr. Alexandre Bella Cruz (UNIVALI)  
Membro interno

Itajaí (SC), 27, fevereiro de 2009.

**Aos meus pais, Luiz e Sônia,  
e a minha irmã, Gláucia,  
pelo apoio e carinho incondicional.**

## AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Ednéia, uma pessoa maravilhosa, paciente e muito competente em tudo que faz. A oportunidade de poder conviver com essa grandiosa mulher me fez crescer como profissional e como pessoa, e por isso serei eternamente grata ao seu apoio;

Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho e a Prof<sup>a</sup> Dra. Maique Weber Biavatti pela colaboração na obtenção dos extratos metanólicos e frações das plantas aqui estudadas;

Aos Profs. Dr. Rilton Alves Freitas e Dr. Alexandre Bella Cruz pela contínua atenção e colaboração neste trabalho;

A Prof<sup>a</sup> Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes e os alunos, Diego e Lucas, da UFMG, pela colaboração no ensino dos ensaios de citotoxicidade com as células tumorais;

A colega de bancada, Carolina, pela imensa ajuda nos experimentos, presente nas férias, feriados e finais de semanas, pela amizade e carinho;

A Ana Paula, do Laboratório de Farmacologia *in vitro*, pela ajuda e paciência na rotina de laboratório;

As minhas colegas e amigas, Maria Cláudia, Vanessa e Glaucia, pelo carinho e amizade, em todos os momentos que juntas rimos, choramos... Obrigada por tudo !!!

Aos meus pais, Luiz e Sônia, que sempre num espírito familiar prezam pela união, o amor e o respeito ao próximo e, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus ideais;

A minha irmã, Glaucia, pelo carinho e atenção em todos os momentos;

A CAPES, pela bolsa concedida;

A Deus, fonte de amor e sabedoria.

**“Sem luta não pode haver vitória.  
Se não existissem as dificuldades, os esforços seriam  
inúteis;  
se não houvesse sofrimento e aprovações,  
não existiriam a paciência e a resignação”**

**Alberto Montalvão**

# **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES LINFOPROLIFERATIVA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS METANÓLICOS E FRAÇÕES DE *Ipomoea pes-caprae* E *Vernonia scorpioides***

**Franciele De Cesaro**

Fevereiro/2009

Orientador: Ednéia Casagrande Bueno, Dra.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas

Número de Páginas: 92

As plantas medicinais têm sido alvo de estudo na busca por novos agentes terapêuticos na medicina moderna, incluindo agentes imunomoduladores e anti-tumorais. O presente estudo avaliou o extrato metanólico (EM) e as frações clorofórmio (CLO) e acetato de etila (AE) de *Ipomoea pes-caprae* e o EM e frações hexano (HEX), diclorometano (DCM) e AE de *Vernonia scorpioides* quanto à atividade imunomoduladora no teste de linfoproliferação com células esplênicas murinas, estimuladas ou não com fitohemaglutinina (PHA) e quanto à atividade citotóxica em células leucêmicas humanas Jurkat, HL60 e HL60-bcl2. O estudo da atividade imunomodulatória empregou células esplênicas murinas (150.000 células/poço) obtidas pelo rompimento mecânico da cápsula do órgão e incubadas em microplacas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas com: meio de cultura (controle negativo); PHA (5 µg/mL, controle positivo de proliferação celular); dimetilsulfóxido (DMSO 10%, controle positivo de citotoxicidade); EMs e frações de *I. pes-caprae* e *V. scorpioides* (10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL), isolada e simultaneamente à PHA ou DMSO. A investigação da atividade citotóxica utilizou células leucêmicas humanas (50.000 células/poço) incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas com: meio de cultura; etoposídeo (10 µM, ETO); DMSO (≤0,5%, utilizado como solvente dos EMs e frações); e EMs e frações de *I. pes-caprae* e *V. scorpioides* (1µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL). A proliferação celular dos ensaios foi quantificada pelo ensaio colorimétrico da redução do MTT (azul de tetrazólio) e expresso em percentagem de crescimento, com os resultados analisados pelos testes Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e t não-pareado. A fração CLO de *I. pes-caprae* mostrou efeito citotóxico nas células esplênicas murinas normais e nas três linhagens de células leucêmicas humanas, enquanto que o EM e a fração AE apresentaram atividade imunoestimuladora nas células normais sem interferir no crescimento das células leucêmicas, sendo a fração AE cerca de 4 vezes mais eficiente (p<0,01). O EM e as frações DCM e HEX de *V. scorpioides* inibiram a proliferação de células esplênicas murinas e mostraram atividade citotóxica frente às células tumorais, exceto a fração HEX frente às células Jurkat. Nas células normais a atividade citotóxica da fração HEX foi 2 vezes maior que EM e demais frações (p<0,05), enquanto que nas células leucêmicas a fração DCM foi no mínimo 2 vezes mais citotóxica que o EM e demais frações (p<0,05). A fração AE desta espécie mostrou atividade citotóxica seletiva, inibindo o crescimento de células tumorais e

estimulando a proliferação das células esplências murinas normais. A super-expressão da proteína bcl2 parece ser modulada por componente(s) presente(s) em ambas as plantas, sugerindo indução de morte celular por apoptose. A continuidade do estudo biomonitorado com as frações de *I. pes-caprae* e de *V. scorpioides* permitirá identificar o(s) constituinte(s) responsável(is) pelas atividades imunoestimuladora e citotóxica encontradas.

Palavras-chave: Atividade citotóxica. Imunomodulação. *Ipomoea*. *Vernonia*.

## **EVALUATION OF LYMPHOPROLIFERATIVE AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF METHANOL EXTRACTS AND FRACTIONS FROM *Ipomoea pes-caprae* AND *Vernonia scorpioides***

**Franciele De Cesaro**

February/2009

Supervisor: Ednéia Casagrande Bueno, Dr.

Area of Concentration: Natural Products and Bioactive Substances

Number of Pages: 92

Medicinal plants have been the subject of study in the search for new therapeutic agents in modern medicine, such as immunomodulating and antitumoral compounds. This study evaluates the immunomodulating activity of methanol extract (ME) and chloroform (CLO) and ethyl acetate (EA) fractions of *Ipomoea pes-caprae*, and ME and hexane (HEX), dichloromethane (DCM) and EA fractions of *Vernonia scorpioides*, by lymphoproliferation assay with murine spleen cells, stimulated or not stimulated with phytohemagglutinin (PHA). It also evaluates the antitumor activity of these fractions on human leukemic cells Jurkat, HL60 and HL60-bcl2. Murine spleen cells (150.000 cells/well) were obtained by mechanical rupture of the spleen, and incubated in 96-well microplates at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 72 hours with: culture medium (negative control), PHA (5 µg/mL, positive control of cell proliferation), dimethylsulfoxide (DMSO 10%, positive control of cytotoxicity), ME and fractions of *I. pes-caprae* and *V. scorpioides* (10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL and 200 µg/mL), individually and simultaneously with PHA or DMSO. The human leukemic cells (50.000 cells/well) were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours with: the culture medium, etoposide (10 mM, positive control of cytotoxicity), DMSO (≤ 0.5%, normal control used as ME and fractions solvent); and ME and fractions of *I. pes-caprae* and *V. scorpioides* (1 µg/mL, 10 µg/mL and 100 µg/mL). Cell proliferation was measured by the colorimetric MTT (tetrazolium blue) reduction test and expressed as a percentage of growth, and the results were analyzed by the Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and non-paired t Tests. The CLO fraction of *I. pes-caprae* showed cytotoxic effect on both normal murine spleen cells and in all three human leukemic cell strains, while the ME and AE fractions showed immunostimulating activity in normal cells without interfering in the growth of leukemic cells, the AE fraction being about 4 times more efficient (p<0,01). The ME and the DCM and HEX fractions of *V. scorpioides* inhibited the proliferation of murine spleen cells and showed cytotoxic activity against the tumor cells, except for the HEX on the Jurkat cells. In normal cells, the cytotoxic activity of the HEX fraction was 2 times higher than the EM and other fractions (p<0,05), while in the leukemic cells, the DCM fraction was at least 2 times more cytotoxic than the ME and the other fractions (p<0,05). The AE fraction of this species showed selective cytotoxic activity, inhibiting the growth of tumor cells and stimulating the proliferation of normal murine spleen cells. The over-expression of the bcl2 protein appears to be modulated by component(s) that are present(s) in

both plants, suggesting the induction of cell death by apoptosis. The continuity of the biomonitored study of *I. pes-caprae* and *V. scorpioides* fractions enables us to identify the constituent(s) responsible for the immunostimulating and cytotoxic activities found.

**Key-words:** Cytotoxic activity. Immunomodulation. *Ipomoea*. *Vernonia*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Foto ilustrativa de linfócito normal (A), hemácea (B) e plaqueta (C) na estensão sangüínea colorada com May-Grunwald Giemsa.....	<b>16</b>
<b>Figura 2</b>	Processo de carcinogênese: estágio de iniciação (A), estágio de promoção (B) e estágio de progressão (C).....	<b>21</b>
<b>Figura 3</b>	Ciclo celular e correlação com atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos.....	<b>23</b>
<b>Figura 4</b>	Processos de morte celular por necrose (A), piroptose (B), autofagia (C) e apoptose (D).....	<b>25</b>
<b>Figura 5</b>	Representação da via extrínseca (A) e intrínseca (B) de ativação da apoptose.....	<b>26</b>
<b>Figura 6</b>	Fotos ilustrativas de <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R.B.....	<b>31</b>
<b>Figura 7</b>	Fotos ilustrativas de <i>Vernonia scorpioides</i> (Lam.) Pers.....	<b>34</b>
<b>Figura 8</b>	Fluxograma do processo de extração dos extratos metanólicos e frações de <i>Ipomoea pes-caprae</i> e <i>Vernonia scorpioides</i> .....	<b>39</b>
<b>Figura 9</b>	Proliferação celular <i>in vitro</i> de células esplênicas murinas frente à fitohemaglutinina (5 µg/mL) em incubação a 37 °C com 5% de CO <sub>2</sub> durante 72 horas, reveladas pela redução do azul de tetrazólio (MTT).....	<b>45</b>
<b>Figura 10</b>	Proliferação de células esplênicas murinas <i>in vitro</i> frente ao extrato metanólico de <i>I. pes-caprae</i> (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	<b>47</b>
<b>Figura 11</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do extrato metanólico de <i>I. pes-caprae</i> (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	<b>50</b>
<b>Figura 12</b>	Proliferação de células esplênicas murinas <i>in vitro</i> frente à fração clorofórmio do extrato metanólico de <i>I. pes-caprae</i> (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	<b>52</b>
<b>Figura 13</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da fração clorofórmio do extrato metanólico de <i>I. pes-caprae</i> (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	<b>54</b>
<b>Figura 14</b>	Proliferação de células esplênicas murinas <i>in vitro</i> frente à fração acetato de etila do extrato metanólico de <i>I. pes-caprae</i> (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	<b>56</b>
<b>Figura 15</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da fração acetato de etila do extrato metanólico	

	de <i>I. pes-caprae</i> (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	58
<b>Figura 16</b>	Proliferação de células esplênicas murinas <i>in vitro</i> frente ao extrato metanólico de <i>V. scorpioides</i> (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	61
<b>Figura 17</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do extrato metanólico de <i>V. scorpioides</i> (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	63
<b>Figura 18</b>	Proliferação de células esplênicas murinas <i>in vitro</i> frente à fração hexano do extrato metanólico de <i>V. scorpioides</i> (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	66
<b>Figura 19</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da fração hexano do extrato metanólico de <i>V. scorpioides</i> (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	68
<b>Figura 20</b>	Proliferação de células esplênicas murinas <i>in vitro</i> frente à fração diclorometano do extrato metanólico de <i>V. scorpioides</i> (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	70
<b>Figura 21</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da fração diclorometano do extrato metanólico de <i>V. scorpioides</i> (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	72
<b>Figura 22</b>	Proliferação de células esplênicas murinas <i>in vitro</i> frente à fração acetato de etila do extrato metanólico de <i>V. scorpioides</i> (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	74
<b>Figura 23</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da fração acetato de etila do extrato metanólico de <i>V. scorpioides</i> (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO <sub>2</sub> .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A2780 – células de câncer de ovário humano
- A431 – células de carcinoma epidermóide humano
- A549 – células de adenocarcinoma de pulmão
- APAF-1 – fator de ativação de protease associada à apoptose 1
- B16F10 – células de melanócitos de melanoma de camundongo
- BGC-823 – células do carcinoma gástrico humano
- ConA – concanavalina A
- D'MEM – meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DO – densidade óptica
- Hela – células de adenocarcinoma de cérvix humano
- Hep-2 – células de carcinoma da laringe humano
- HL60 – células de leucemia promielocítica aguda humano
- HL60-bcl2 – células HL60 transfectada com super-expressão da proteína antiapoptótica bcl2
- Jurkat – células de leucemia aguda de linfócitos T humano
- L929 – células de fibroblastos de adipócitos de camundongo
- LNCaP – células de adenocarcinoma de próstata humano
- MCF-7 – células epiteliais de câncer da mama humano
- Molt – células de leucemia linfoblástica aguda de células T humana
- MTT – azul de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio)
- NIQFAR - Núcleo de Investigação de Química Farmacêutica
- P388 – células de tumor linfoide de camundongo
- PHA - fitohemaglutinina
- Raji – células de linfoma de Burkii humano
- RPMI – meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*
- TCR – receptor de célula T
- U937 – células de linfoma histiocítico humano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>14</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Sistema Imune</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1.1 Atividade imunomodulatória de compostos naturais</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 Câncer e apoptose</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.1 Atividade antitumoral de compostos naturais</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3 Plantas Medicinais</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3.1 Gênero <i>Ipomoea</i></b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.2 Gênero <i>Vernonia</i></b> .....	<b>33</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1 Tipo e local de estudo</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2 Material vegetal</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3 Proliferação celular <i>in vitro</i></b> .....	<b>40</b>
<b>4.4 Atividade citotóxica <i>in vitro</i></b> .....	<b>42</b>
<b>4.5 Análise estatística</b> .....	<b>43</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1 <i>Ipomoea pes-caprae</i></b> .....	<b>47</b>
<b>5.2 <i>Vernonia scorpioides</i></b> .....	<b>61</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A modulação da resposta imune no controle ou na cura de doenças tem sido área de interesse crescente em estudo. Esta modulação altera o sistema imune, interferindo nas funções do mesmo, podendo apresentar como resultados a imunoestimulação ou a imunossupressão. A exacerbação das reações imunes é definida como imunoestimulação, enquanto que a imunossupressão implica principalmente na diminuição da resistência a infecções (PATWARDHAN et al., 1990; MAKARE; BODHANKAR; RANGARI, 2001). Desde a década de 80, considerando a necessidade de controle e equilíbrio entre as duas atividades para o funcionamento normal e adequado do sistema imunológico, a identificação e a caracterização de compostos naturais com atividade imunomodulatória tem se apresentado como área de interesse científico de vários grupos de pesquisadores ligados à produção e desenvolvimento de novos fármacos. Entretanto, estudos acerca do estímulo ou da supressão da resposta imune promovidos pelas plantas conhecidas popularmente pelo uso medicinal ainda são escassos (PHILLIPSON, 2003).

A avaliação da atividade imunomodulatória de compostos naturais tem sido determinada por diferentes metodologias, tanto em modelos *in vivo* e *ex vivo*, quanto em modelos *in vitro*. A linfoblastogênese, também conhecida como teste de linfoproliferação ou teste de proliferação de linfócitos, é um dos modelos empregados para avaliar a estimulação e a supressão da resposta proliferativa a estes compostos. No modelo animal, o estudo *in vitro* ocorre quando as células esplênicas são obtidas de animais sem tratamento, sendo o composto adicionado diretamente na cultura celular. Esse modelo permite a avaliação da atividade dos compostos na presença ou na ausência de mitógenos, como a lectina fitohemaglutinina (PHA), que estimula os linfócitos T independentemente da especificidade e mimetizam a ativação induzida pelo antígeno estranho ao sistema de defesa (PANDIMA DEVI et al., 2003).

A metodologia de cultivo celular primário empregando células esplênicas murinas, recentemente padronizada e aplicada no estudo de extratos metanólicos de algumas plantas medicinais da flora catarinense, apresentou resultados promissores

para as plantas medicinais *Ipomoea pes-caprae* e a *Vernonia scorpioides*, a primeira aumentando o crescimento de células e a segunda com efeito oposto, ambas em comparação com o controle positivo de proliferação celular promovido pelo mitógeno PHA (ZANDONAI, 2007).

A identificação de compostos naturais com possível atividade antitumoral também é área de interesse, devido ao câncer constituir a segunda causa de morte da população na maioria dos países e que vários fármacos empregados no tratamento são derivados de produtos naturais (CARVALHO, 2006). A identificação dos compostos com potencial atividade antitumoral incluem o emprego de linhagens celulares de cultivo *in vitro*, como o modelo de linhagens de células leucêmicas humanas empregado na identificação de atividade antitumoral de compostos sobre células hematopoiéticas malignas (FLEISCHER et al., 2006). Como exemplo, os lipopentassacarídeos obtidos do extrato hexânico de *I. pes-caprae* mostraram pouca atividade citotóxica sobre as linhagens de células humanas tumorais de nasofaringe, cólon, cervical e de ovário (PEREDA-MIRANDA; ESCALANTE-SANCHÉZ; ESCOBEDO-MARTÍNEZ, 2005). Em contrapartida, a atividade antitumoral da *V. scorpioides* demonstrou citotoxicidade tanto no modelo de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos (PAGNO et al., 2006) quanto nas linhagens celulares de adenocarcinoma de cérvix humano (Hela), de fibroblastos de adipócitos de camundongo (L929) e de melanócitos de melanoma de camundongo (B16F10) (BUSKÜL, 2007).

Considerando os fatores acima mencionados acerca da importância da imunomodulação e da relevância clínica dos compostos naturais neste contexto, tanto em processos infecciosos, imunodeficiências e câncer, quanto em indivíduos transplantados, o presente projeto propõe o estudo do extrato metanólico e das frações clorofórmio e acetato de etila de *I. pes-caprae* e do extrato metanólico e das frações hexano, diclorometano e acetato de etila de *V. scorpioides* na atividade linfoproliferativa de células esplênicas murinas e na atividade citotóxica em linhagens de células leucêmicas humanas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar as atividades linfoproliferativa e citotóxica dos extratos metanólicos e frações de *I. pes-caprae* e *V. scorpioides*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito do extrato metanólico e das frações clorofórmio e acetato de etila de *I. pes-caprae* no teste de proliferação de células esplênicas de camundongos, estimuladas ou não com o mitógeno PHA;
- Analisar o efeito do extrato metanólico e das frações hexano, diclorometano e acetato de etila de *V. scorpioides* no teste de proliferação de células esplênicas de camundongos, estimuladas ou não com o mitógeno PHA;
- Determinar o potencial citotóxico *in vitro* dos extratos e frações de *I. pes-caprae* e de *V. scorpioides* nas linhagens de células leucêmicas humanas Jurkat, HL60 e HL60-bcl2, identificando a relação da proteína antiapoptótica bcl2 no processo de morte celular;
- Discutir, de acordo com estudos fitoquímicos previamente relatados na literatura, a característica quanto à polaridade dos possíveis compostos de *I. pes-caprae* e *V. scorpioides* com atividade imunomoduladora e citotóxica.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Sistema Imune

O sistema imune, imprescindível à sobrevivência do indivíduo, é capaz de reconhecer os organismos estranhos invasores, impedir sua disseminação e eliminá-los do corpo humano. Este complexo sistema responsável pela imunidade é constituído por moléculas protéicas solúveis e células, que são principalmente os leucócitos e as células teciduais relacionadas a eles. Os leucócitos se diferem em duas linhagens hematopoiéticas principais, a série mielóide que é responsável pela formação dos monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, e a série linfóide, que origina os diferentes tipos de linfócitos (PAUL, 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A imunidade é classificada em duas categorias, a inata ou inespecífica e a adquirida ou específica. A imunidade inata proporciona a defesa inicial contra os microrganismos e exerce funções importantes na indução da resposta imune específica. Esta imunidade é composta por diferentes elementos, tais como: barreiras físicas e químicas – pele, mucosas, secreções e suco gástrico; proteínas solúveis – complemento e citocinas; células fagocitárias – macrófagos, neutrófilos e células dendríticas; e outros leucócitos – mastócitos, eosinófilos, basófilos e células *natural killer*. Cada um desses componentes da imunidade inata reage de forma similar frente a todas as substâncias estranhas, e não varia de indivíduo para indivíduo e tampouco em exposições sucessivas ao mesmo patógeno (PARHAM, 2001; MACHADO et al., 2004).

Contrariamente, a imunidade adquirida é desenvolvida especificamente contra o antígeno frente ao qual o sistema imune do indivíduo foi exposto. Essa resposta imune específica facilita os mecanismos protetores da imunidade inata, tornando-a mais efetiva na eliminação dos antígenos estranhos. O sistema imune específico tem como característica a memória imunológica de cada microrganismo ou antígeno estranho ao qual foi exposto, de modo que os contatos subseqüentes ao mesmo antígeno estimulam mecanismos de defesa crescentemente mais rápidos e eficazes (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Um estímulo antigênico estranho raramente desencadeia uma resposta isolada. Ao contrário, ocorre o desencadeamento da ação de vários elementos da resposta de defesa, alguns dos quais atuam em conjunto ou, ocasionalmente, podem ser conflitantes entre si. Deste modo, as imunidades inata e adquirida não são independentes, mas tem influencia uma sobre a outra, diretamente ou indiretamente por meio da liberação de citocinas. De qualquer maneira, todas as respostas dependem de três princípios básicos, o reconhecimento, a mobilização e o ataque. Resumidamente, essas respostas são iniciadas pelo reconhecimento de antígenos estranhos, que levam à ativação dos linfócitos que reconhecem especificamente o antígeno, culminando no desenvolvimento de mecanismos que medeiam a função fisiológica da resposta (PARHAM, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os linfócitos (Figura 1), células envolvidas na resposta imune adquirida, são classificados em linfócitos B e linfócitos T. Os linfócitos B são responsáveis pelo desenvolvimento da resposta imune humoral, mediada por anticorpos, enquanto que os linfócitos T são responsáveis pelo desenvolvimento da resposta imune celular. Os linfócitos T são divididos em duas classes principais, diferenciadas pela expressão das glicoproteínas de superfície celular CD4 (linfócito T auxiliar ou *helper*) e CD8 (linfócito T citotóxico), ambos com funções distintas no sistema de defesa. Os linfócitos B e T são produzidos na medula óssea, definido como tecido linfoide primário, embora o amadurecimento ocorra em sítios diferentes. O amadurecimento dos linfócitos B ocorre na própria medula óssea, enquanto que os linfócitos T amadurecem no timo, o outro órgão linfoide primário. Quando maduros, os linfócitos B e T aptos a responder aos patógenos invasores ficam armazenados nos tecidos linfoides secundários, como o baço e os gânglios linfáticos (PARHAM, 2001; PAUL, 2003).

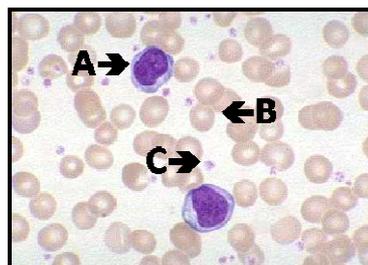


Figura 1. Foto ilustrativa de linfócito normal (A), hemácea (B) e plaqueta (C) na estensão sanguínea colorada com May-Grunwald Giemsa.

Fonte: VÍTOR (2008).

A resposta dos linfócitos aos antígenos estranhos durante a fase de ativação consiste, primeiramente, na síntese de novas proteínas como citocinas e respectivos receptores. Como sequência da resposta ocorre a proliferação celular, uma vez que os linfócitos ativados dividem-se de forma mitótica o que resulta na proliferação e no aumento de tamanho do clone antígeno-específico, processo denominado de expansão clonal. Por fim, ocorre a diferenciação em células efetoras cuja função é eliminar o antígeno e ainda a manutenção de células de memória. Os linfócitos B, diferentemente dos linfócitos T, amadurecem originando os plasmócitos que secretam as proteínas solúveis efetoras da resposta imune humoral, as imunoglobulinas ou os anticorpos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Atualmente o emprego de experimentos *in vitro* permite avaliar as células do sistema imune no desenvolvimento da resposta de defesa (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Várias são as metodologias que permitem a avaliação da resposta imune *in vitro*, com o objetivo de determinar a estimulação ou a supressão da mesma. Algumas das técnicas de avaliação da resposta imune são realizadas a partir do isolamento inicial de populações linfocitárias do sangue periférico humano. Quando o estudo é realizado em modelo animal, estas mesmas metodologias empregam geralmente células esplênicas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

A maior parte do conhecimento atual acerca dos eventos celulares na ativação dos linfócitos é baseada em experimentos *in vitro*, em que os linfócitos podem ser estimulados de modo controlado e as respostas destes ao estímulo podem ser medidas com precisão. As respostas funcionais destas células podem ser facilmente estudadas pelo uso de ativadores policlonais ou mitógenos. Estes mitógenos se ligam a complexos formados pelo receptor de célula T (TCR) e a glicoproteína de superfície CD3 presentes na membrana do linfócito T. Esta ligação ocorre independentemente da especificidade do TCR, mimetizando assim a ativação induzida antígeno ao sistema de defesa (PAUL, 2003).

As lectinas extraídas de plantas são exemplos de mitógenos, uma vez que se ligam especificamente a certos resíduos de açúcares nas glicoproteínas do complexo TCR : CD3 da superfície do linfócito T, estimulando-os. As lectinas PHA e concanavalina A (ConA) são proteínas vegetais poliméricas comumente empregadas para a ativação dos linfócitos T, enquanto o *pokeweed mitogen* (PWM) ativa linfócitos B dependentes de linfócitos T (ROCHA; GORESCO; BELTRAME, 2007).

O teste de proliferação linfocitária é um dos modelos de experimentos *in vitro* que avalia, em cultura celular, as respostas dos linfócitos em contato com antígenos específicos ou mitógenos. A ativação da resposta imune promove a proliferação celular com o aumento do número de células na cultura em um período aproximado de 48 horas. Conseqüentemente, esta ativação pode ser identificada pela contagem celular em microscopia, pela incorporação de marcador radioativo ao DNA (ácido desoxirribonucléico) (ROCHA; GORESCO; BELTRAME, 2007), pela redução do azul de tetrazólio {MTT, [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio]} (MOSMANN, 1983), pela incorporação lisossomal do corante vermelho neutro (BORENFREUND, 1992), bem como pela detecção de receptores de membrana, como os receptores para interleucina-2 e o marcador precoce de ativação celular CD69, estes dois últimos por meio de citometria de fluxo (CENTNER; WECK, 1995; BUENO et al., 1999). A citometria de fluxo tem sido indicada como alternativa metodológica na investigação da ação de extratos de plantas ou de substâncias puras sobre a imunomodulação de células mononucleares humanas (MACHADO Jr. et al., 2006).

A avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT baseia-se na determinação do consumo de oxigênio pelas células, ou seja, quanto maior o consumo de oxigênio maior será a coloração observada, correspondendo diretamente à quantidade de células presentes na cultura. Isto porque a desidrogenase mitocondrial das células vivas e metabolicamente ativas cliva o anel de tetrazólio do corante e o converte em cristal azul de formazan. Na seqüência, a dissolução dos cristais permite a leitura colorimétrica em espectrofotômetro a 540-590 nm (MOSMANN, 1983).

O emprego clínico dos agentes imunomoduladores propicia efeitos de grande utilidade na prática clínica. A imunoestimulação tem aplicação no auxílio ao sistema imune em casos de imunodeficiências e no combate aos processos infecciosos. Por outro lado, a imunossupressão é indicada em casos de autoimunidades, hipersensibilidades e, principalmente, no controle do sistema imune com vistas a evitar o processo de rejeição em indivíduos transplantados (LIMA, 2004). Assim, a busca por compostos naturais com atividade imunomodulatória tem se apresentado como área de interesse científico de vários grupos de pesquisadores ligados à produção e desenvolvimento de novos fármacos, embora ainda escassos (PANDIMA DEVI et al., 2003).

### 3.1.1 Atividade imunomodulatória de compostos naturais

A identificação de compostos naturais com efeito proliferativo e/ ou citotóxico, tem sido alvo de pesquisa por diversos grupos da área de fitofármacos. Um levantamento de 1010 drogas com indicação clínica durante um período de 25 anos (1981-2006) mostrou que 43 fármacos (4,25%) são de origem natural e que, dentre estes, oito possuem ação estimuladora ou supressora sobre o sistema imune (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Kanjwani e colaboradores (2008) demonstraram que linfócitos isolados do sangue periférico humano frente ao extrato metanólico de *Piper betel*, na presença e na ausência de PHA, inibem de forma dose-dependente a proliferação celular e a produção de interferon-gama. Em outro modelo de estudo, Wilasrusmee e colaboradores (2002) identificaram efeito estimulador em células esplênicas de camundongos C57 estimuladas com ConA para *Angelica sinensis*, *Panax ginseng*, *Silybum marianum* e *Hypericum perforatum* e supressor para *Camellia sinensis* e *Zingiber officinale*, e dentre estas plantas, apenas *Panax ginseng* não mostrou atividade quando cultivado na ausência do mitógeno. A avaliação de seis extratos metanólicos de plantas medicinais da flora catarinense no ensaio de proliferação celular *in vitro* com células esplênicas murinas verificou duas espécies com efeito imunestimulador, a *Calophyllum brasiliense* e a *Ipomoea pes-caprae*, e outras duas espécies com efeito imunossupressor, a *Rubus imperialis* e a *Vernonia scorpioides* (ZANDONAI, 2007).

Estudos com compostos isolados também têm sido alvo de avaliação linfoproliferativa. Zhao e colaboradores (2005) isolaram e caracterizaram um polissacarídeo, (1-6)- $\alpha$ -D-glucan das raízes de *Ipomoea batatas*, que no ensaio biológico mostrou atividade proliferativa em células esplênicas de camundongos na presença e na ausência do mitógeno ConA. Em contrapartida, López-Posadas e colaboradores (2008) demonstraram que outros compostos, os flavonoides apigenina, canferol, crisina, daidzeína, diosmetina, genisteína, hesperetina, luteolina e quercetina, apresentaram potente efeito antiproliferativo frente às células esplênicas de ratos na presença e na ausência do mitógeno ConA.

### 3.2 Câncer e apoptose

O câncer, segundo a Organização Mundial da Saúde, constitui a terceira causa de óbitos no mundo. No Brasil, esta doença representa a segunda causa de morte da população, superada somente pelas doenças do sistema cardiovascular (ALMEIDA et al., 2005; CARVALHO, 2006). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (BRASIL, 2008), as estimativas para o ano 2008 e válidas também para o ano de 2009 apontam 466.730 novos casos de câncer no Brasil. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino.

A denominação câncer tem origem latina e significa “carangueijo”, tendo sido inicialmente empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante e que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção. A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas (ALMEIDA et al., 2005).

As alterações que causam as neoplasias podem ocorrer em genes especiais denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quanto ativados, estes protooncogenes transformam-se em oncogenes e são responsáveis pela transformação das células normais em malignas. Estas células diferentes são, então, denominadas cancerosas ou tumorais. As células tumorais possuem a característica de se multiplicar de maneira descontrolada, ocorrendo a formação de novos vasos sanguíneos para a nutrição das células, a angiogênese. O acúmulo de massa dessas células forma os tumores malignos, que podem se desprender e migrar até órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases (Figura 2) (INCA, 1996; ALMEIDA et al., 2005).

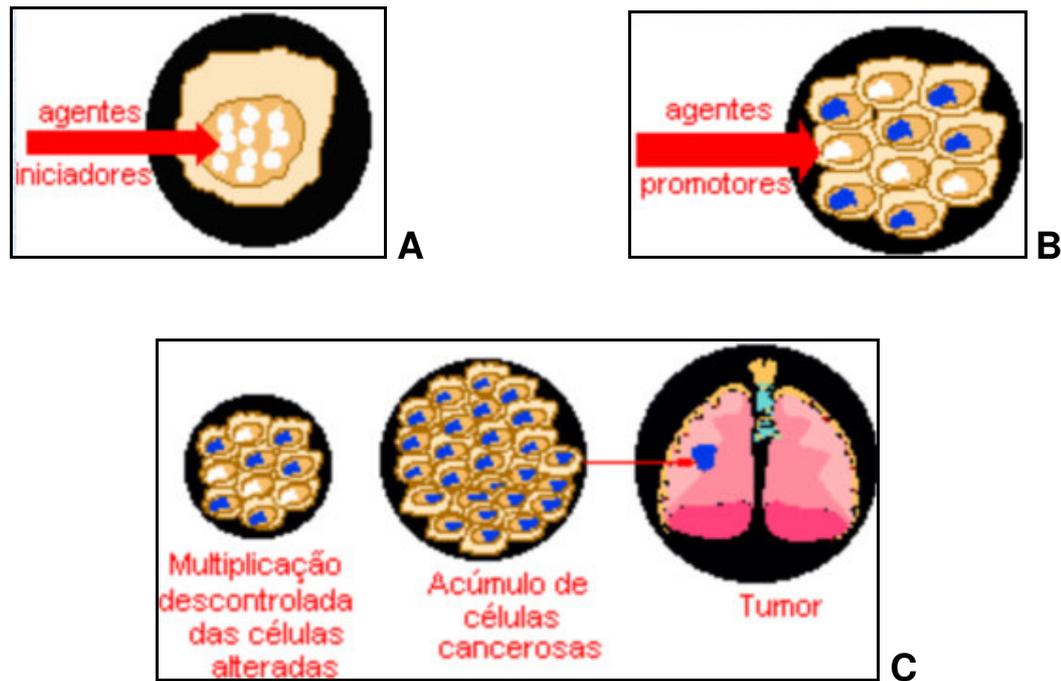


Figura 2. Processo de carcinogênese: estágio de iniciação (A), estágio de promoção (B) e estágio de progressão (C).

Fonte: INCA (1996).

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação de câncer, em geral ocorre lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. A carcinogênese é constituída por três estágios: o estágio de iniciação, no qual as células têm o efeito de um agente carcinogênico que provoca as modificações nos genes (Figura 2A); o estágio de promoção, quando as células geneticamente alteradas são transformadas em células malignas de forma lenta e gradual, devido ao contato contínuo com o agente cancerígeno promotor (Figura 2B); e o estágio de progressão, quando as células caracterizam-se pela multiplicação descontrolada (Figura 2C) (INCA, 1996).

A classificação primária do câncer é realizada de acordo com o tipo de célula normal que o originou, como exemplo a leucemia. Este câncer, originado de células da medula óssea que produzem os leucócitos, promove elevada concentração de células que não funcionam apropriadamente e ainda restringem o espaço da medula óssea para que novas células sejam produzidas (ALMEIDA et al., 2005).

O tratamento do câncer inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A técnica cirúrgica pode remover o tumor com eficácia, desde que não haja metástases. A

radioterapia geralmente é usada em conjunto com a cirurgia, elevando a eficiência do tratamento. Contudo, quando a neoplasia é caracterizada pelo desenvolvimento precoce de micro-metástases, ocorre necessidade de abordagem sistêmica e que pode ser efetuada com a quimioterapia. A quimioterapia tem o objetivo de destruir as células neoplásicas, preservando as normais (TOMASICH et al., 2003; BERTO et al., 2006). Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, mas particularmente aquelas de rápido crescimento, como as gastrintestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia, como náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções (ALMEIDA et al., 2005).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram em determinada fase do ciclo celular, e por isso são denominados fármacos ciclo-celular específicos (Figura 3). Os produtos naturais ciclo-celular específicos são agentes antineoplásicos importantes e eficientes, correspondendo a muitos dos fármacos usados na terapia clínica do câncer e que originalmente não são compostos sintéticos (ALMEIDA et al., 2005). Dentre alguns produtos naturais citotóxicos usados clinicamente no tratamento de neoplasias destacam-se os alcaloides vegetais, como os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina), o taxol (paclitaxel) e as podofilotoxinas (etoposídeo e teniposídeo). A vincristina, vimblastina e taxol inibem a formação do fuso mitótico na fase M do ciclo celular, enquanto que o etoposídeo e teniposídeo inibem a enzima topoisomerase II, promovendo a lesão no DNA nas fases S e G<sub>2</sub> (CRAGG; NEWMAN, 2005; 2007).

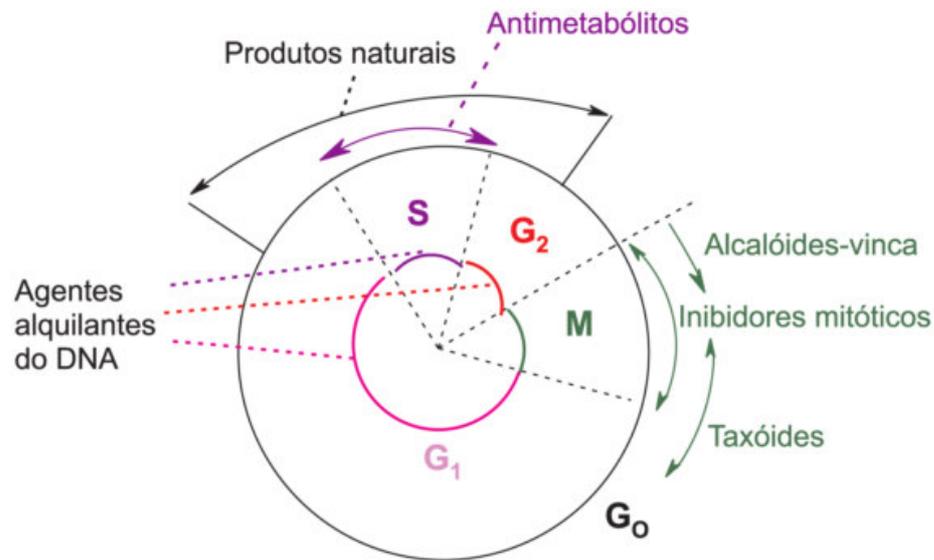


Figura 3. Ciclo celular e correlação com atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos.

Fonte: ALMEIDA et al. (2005).

Diversos mecanismos estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna, mas a maior parte deles estão relacionados com o ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005). No ciclo celular, a célula que está em repouso e apresenta o DNA super-enovelado encontra-se na fase  $G_0$ . Quando a célula prepara-se para a multiplicação e produz constituintes celulares para a síntese de DNA, denomina-se fase  $G_1$ . A síntese e duplicação do DNA da célula correspondem à fase S, enquanto que a síntese de componentes para a mitose ocorre na fase  $G_2$ . Após a divisão do material nuclear há a citocinese na fase M, finalizando o ciclo de replicação celular com retorno à fase de repouso ( $G_0$ ). A célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular, ou seja, não retorna à fase  $G_0$  e entra diretamente em nova fase  $G_1$ . Nas fases  $G_1$  e S existem mecanismos reguladores que podem afetar a multiplicação celular, como a apoptose (ALMEIDA et al., 2005; PELUZIO et al., 2006).

A morte celular pode ocorrer por diversos processos, conhecidos como necrose, piroptose, autofagia e apoptose (Figura 4). Esses quatro processos de morte celular apresentam grupos distintos de características bioquímicas e morfológicas, tendo algumas destas compartilhadas. Enquanto a apoptose e a

autofagia não induzem o processo inflamatório, a liberação de citocinas e do conteúdo citoplasmático durante a piroptose e a necrose são potentes indutores de eventos inflamatórios. De forma geral, a via de morte celular dos linfócitos acontece por apoptose, enquanto que os macrófagos e as células dendríticas morrem preferencialmente por piroptose e em alguns casos por apoptose (LABBÉ; SALEH, 2008).

A necrose é o processo de morte no qual as células sofrem uma injúria que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular e instalação do processo inflamatório (Figura 4A) (ROBBINS; COTRAN, 2005; ANAZETTI; MELO, 2007). A morfologia de uma célula em piroptose ainda não é totalmente conhecida, contudo, a literatura descreve que as células piroptóticas apresentam uma combinação distinta de características físicas compartilhadas com os processos de apoptose e necrose. As células piroptóticas apresentam deficiência no potencial de membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e condensação nuclear, assim como as células apoptóticas. Ocorre a ruptura da membrana plasmática liberando o conteúdo intracitoplasmático desenvolvendo um potente evento inflamatório, semelhante ao que ocorre no processo de necrose (Figura 4B) (LABBÉ; SALEH, 2008).

A autofagia é um processo adaptivo conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Ela ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares. Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana originando os autofagossomos, que irão se fundir com os lisossomos. Por seguinte, o conteúdo dos autofagossomos será degradado pelas hidrolases lisossomais (Figura 4C) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Já, durante a apoptose a célula tem alterações morfológicas, como retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são fagocitados e, diferentemente da necrose e piroptose, não ocorre processo inflamatório (Figura 4D) (ROBBINS; COTRAN, 2005; ANAZETTI; MELO, 2007).

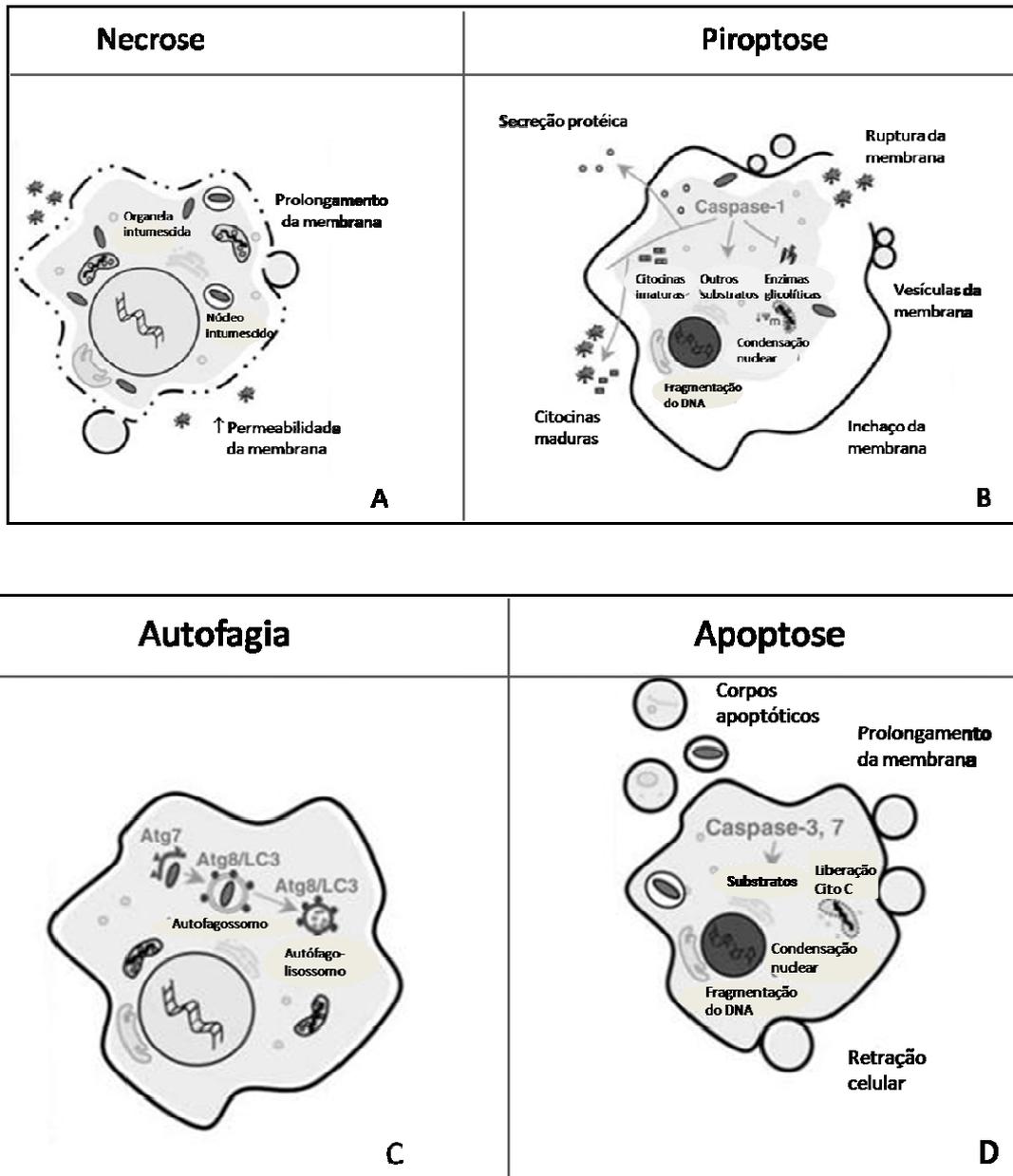


Figura 4. Processos de morte celular por necrose (A), piroptose (B), autofagia (C) e apoptose (D).

Fonte: Adaptado de LABBÉ; SALEH (2008).

A apoptose é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, tendo importância na eliminação de células supérfluas ou defeituosas. Apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos. Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, como ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos,

radiação ionizante, danos ao DNA e choque térmico entre outros. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca – citoplasmática, ou pela via intrínseca – mitocondrial (Figura 5) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

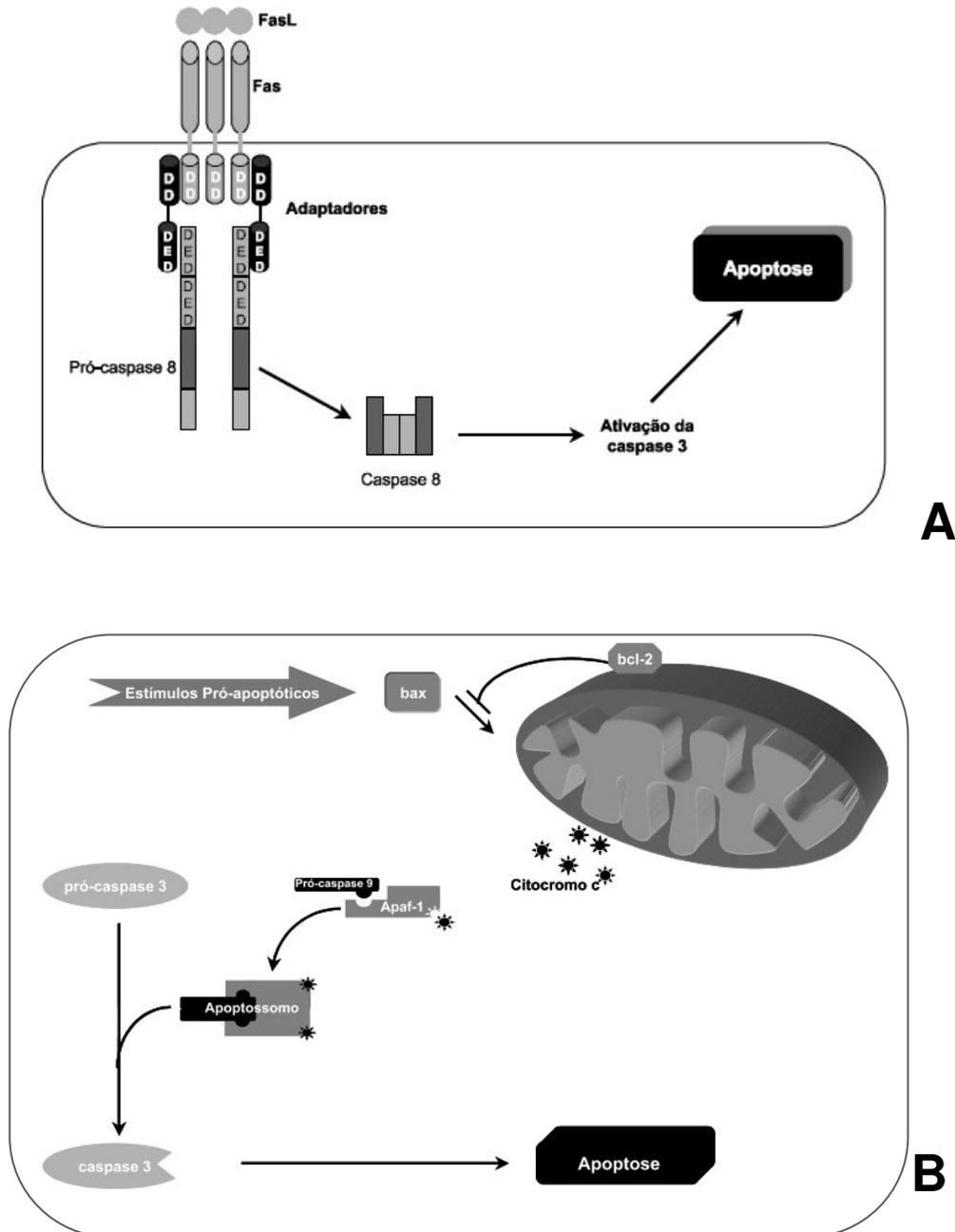


Figura 5. Representação da via extrínseca (A) e intrínseca (B) de ativação da apoptose. Fonte: GRIVICICH; REGNER; ROCHA (2007).

Resumidamente, a ativação da apoptose pela via extrínseca tem início com a ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral, desencadeando a ativação da cascata das caspases que, por sua vez, inicia o processo apoptótico (Figura 5A). Em contrapartida, a via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. A mitocôndria é a principal organela celular mediadora da morte celular por apoptose nesta via, integrando os estímulos de morte celular que induzem à permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas próapoptóticas nela presentes. Em resumo, após o estímulo pró-apoptótico a proteína Bax se associa à bcl2 induzindo a liberação de citocromo *c* para o citoplasma, que associado ao fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (APAF-1) ativa a cascata das caspases e conduz à apoptose (Figura 5B) (OHBA et al., 2004; ANAZETTI; MELO, 2007).

A família Bcl2 é uma família de proteínas que participam da regulação da apoptose com ação pró-apoptóticas e antiapoptóticas. Os membros antiapoptóticos desta família, como bcl2 e bcl-XL, inibem a apoptose pois previnem a liberação do citocromo *c*. A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse processo de morte celular tem conduzido uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

### **3.2.1 Atividade antitumoral de compostos naturais**

Deste modo, além da identificação de compostos naturais com efeito imunomodulador, tem sido área de interesse na medicina moderna a identificação de compostos com atividade antitumoral. Este interesse fica maior evidenciado se considerada a eficácia de fármacos antitumorais utilizados na clínica como paclitaxel, docetaxol, etoposídeo e alcaloides da vinca, bem como antimaláricos como quinina e artemisina, que representam alguns exemplos da importância de produtos naturais na descoberta de novos fármacos (NIERO et al., 2003). O

etoposídeo é um agente antineoplásico semi-sintético derivado da podofilotoxina, presente na resina do *Podophyllum peltatum* L., que tem sido usado de maneira efetiva no tratamento de linfomas e câncer de testículos e brônquios (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Os fármacos antineoplásicos constituem uma parte indispensável do arsenal terapêutico no combate às malignidades. Os estudos que objetivam identificar compostos com atividade antitumoral incluem o emprego de linhagens celulares de cultivo *in vitro*. Estas linhagens celulares são diversificadas em termos de origem e de espécie. Como exemplo, o modelo de linhagens de células leucêmicas humanas é empregado na identificação de atividade antitumoral de compostos sobre células hematopoiéticas malignas. As células Jurkat são uma linhagem imortalizada de linfócitos T humanos, utilizada em estudos de leucemia aguda de células T. A HL60 é uma linhagem originada de paciente com leucemia promielocítica aguda, enquanto que a HL60-bcl2 é uma linhagem HL60 transfectada estavelmente com a proteína antiapoptótica bcl2, o que confere resistência à apoptose pela superexpressão dessa proteína (FLEISCHER et al., 2006).

As linhagens celulares Jurkat, HL60, K562 (leucemia mielocítica crônica) e Molt-4 (leucemia linfoblástica aguda de células T), avaliadas frente ao alcaloide piplartina obtido das espécies de *Piper*, demonstraram que o composto apresenta efeito citotóxico dose-dependente nas quatro linhagens (BEZERRA et al., 2007). Outro estudo com a linhagem celular HL60 identificou o potencial antiproliferativo de diferentes preparações etanólicas de *Uncaria tomentosa*, tendo maior citotoxicidade a preparação com predominância dos alcaloides pteropodina e isomitrafalina (PILARSKI et al., 2007). Da mesma forma, o extrato aquoso de *Oldenlandia diffusa* também apresentou efeito citotóxico nessa linhagem de células (WILLIMOTT et al., 2007).

Muitos fármacos utilizados na clínica contra o câncer ativam as vias de sinalização apoptótica, mudando o *status* dos parâmetros fisiológicos monitorados ativamente em células cancerosas. Desta forma, a manipulação do maquinário bioquímico que regula a apoptose é um novo e interessante campo de pesquisa para o câncer (PEREZ-TOMÁS et al., 2003; KAMB; LASSOTA, 2004; FLEISCHER et al., 2006). Como exemplo, um composto obtido da fração butanólica de *Albizzia jullibrissin* apresentou atividade citotóxica frente às células Jurkat pela ativação da apoptose pela via intrínseca, sendo o efeito citotóxico menor em células

mononucleares humanas (WON et al., 2006). O composto fenólico artepillin C, obtido da própolis brasileira, têm apresentado atividade citotóxica relacionada à indução de apoptose pelo aumento na permeabilidade das membranas mitocondriais, liberação do citocromo *c* e conjugação deste com APAF-1 e procaspase-9, ativando a cascata das caspases (GALATI et al., 2000).

Um dos alvos terapêuticos promissores responsáveis pela regulação do mecanismo apoptótico nas células incluem as proteínas antiapoptóticas bcl2 (EVAN; VOUSDEN, 2001; MELNIKOVA; GOLDEN, 2004; FLEISCHER et al., 2006). Assim, o estudo com a linhagem HL60-bcl2 é fundamentada no fato de que o principal obstáculo para o eficaz tratamento do câncer quase sempre é a resistência das células cancerosas aos fármacos empregados. A resistência das células cancerosas a apoptose tem sido descrito como um dos fatores determinantes para a sobrevivência celular, reforçando a necessidade de novos fármacos eficazes contra células tumorais e com menor toxicidade para células normais. A expressão ectópica de proteínas antiapoptóticas como bcl2 confere proteção contra uma série de estímulos apoptogênicos, e a transfecção estável com esta proteína torna a linhagem resistente à apoptose. Desta forma, a avaliação desta linhagem celular frente a compostos naturais apresenta-se como alvo de interesse na identificação de novos agentes antitumorais (PEREZ-TOMÁS et al., 2003; KAMB; LASSOTA, 2004; FLEISCHER et al., 2006).

### **3.3 Plantas Medicinais**

A flora brasileira é diversificada e muitas plantas são usadas na medicina popular para a cura de doenças (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). O uso de plantas com fins medicinais por meio da ingestão de ervas e folhas caracteriza uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais, que tem sido uma tendência generalizada na medicina popular brasileira e tem contribuído significativamente para o consumo de plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos (PEREIRA et al., 2004; SIMÕES, 2000)

As plantas consagradas pelo uso popular foram estudadas inicialmente com vistas ao isolamento e à determinação estrutural das substâncias ativas. A importância das plantas para a medicina permitiu o desenvolvimento de vários

campos específicos, nos quais muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até os dias de hoje como medicamentos, a exemplo dos salicilatos obtidos de *Salix alba* (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001). A medicina moderna também se beneficia dos compostos de origem natural, que modificados podem ainda tornar-se mais eficazes ou menos tóxicos. Além disso, os produtos naturais têm utilidade como protótipo ou modelo para fármacos sintéticos que desempenham atividades fisiológicas semelhantes à dos fármacos originais (ROBBERS; SPEEDIE; WARRS, 1997; YUNES; CECHINEL FILHO, 2007).

No Brasil, sabe-se que menos de 5 a 15% das plantas foram avaliadas na busca por substâncias biologicamente ativas. O potencial das plantas como fonte de substâncias bioativas é um campo ainda muito pouco explorado. Dentre as 250.000 espécies estimadas no planeta, somente uma pequena porcentagem foi pesquisada quanto à sua constituição química. Considerando o número de plantas submetidas a ensaios biológicos ou farmacológicos, esse percentual é ainda menor (OLIVEIRA; BRAGA, 2003). A importância do estudo de plantas medicinais pode ser evidenciada não só como embasamento científico de uma medicina alternativa, mas como fonte de novos e potentes fármacos. Ainda, a invejável flora brasileira estimula a procura de novas substâncias de origem vegetal na cura de doenças ainda sem tratamento ou profilaxia adequadas (CALIXTO, 2001).

Apesar da grande quantidade de fármacos disponíveis no mercado, muitas doenças ainda não possuem tratamento adequado, como câncer, doenças infecciosas, cardiovasculares, do sistema nervoso central e alguns processos inflamatórios, dolorosos, alérgicos e auto-ímenes (WAGNER, 2007). Justamente por isto a comunidade científica tem buscado obter moléculas ativas contra esses males a partir de fontes naturais, sendo que algumas classes de metabólitos secundários como terpenos, alcaloides, flavonoides, entre outros, já têm demonstrado atividades satisfatórias *in vitro* e *in vivo* (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; CALIXTO et al., 2000; CECHINEL FILHO, 2000; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

### **3.3.1 Gênero *Ipomoea***

As plantas pertencentes ao gênero *Ipomoea*, maior gênero da família *Convolvulaceae*, consistem em mais de 200 espécies amplamente distribuídas nos

países tropicais e subtropicais (SOUZA et al., 1998; JUDD et al., 1999). Esta família agrupa aproximadamente 50 gêneros e mais de 1.000 espécies (SILVA; LOPES; MAGALHÃES, 2002), que em geral são lianescentes, ocorrendo também na forma de arbustos e de pequenas árvores (CORRÊA, 1984; JOLY, 1987).

A *I. pes-caprae* (L.) R. Brown (Figura 6) é conhecida no Brasil como salsa-da-praia ou batata-da-praia. Esta espécie é uma planta perene, com um sistema caulinar de ramos longos que podem atingir até 40 metros de comprimento. A planta possui raiz tuberosa e caule radicante; folhas bilobas, cordiformes, longo-pecioladas; flores grandes e roxas; e fruto cápsula pequeno. A espécie é freqüente no pós-praia e duna frontal em toda a região tropical e em regiões temperadas quentes (CORRÊA, 1984). Um estudo da planta na Ilha de Florianópolis identificou a ocorrência desta em nove de dez praias estudadas, entre elas Lagoinha, Jurerê, Armação e Joaquina (CASTELLANI; SANTOS, 2006).

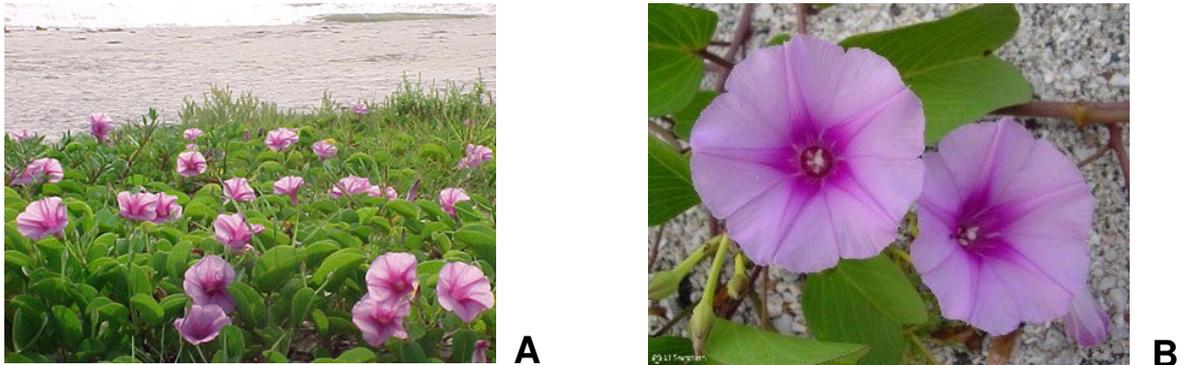


Figura 6. Fotos ilustrativas de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.B.

Fonte: PERRY, 2007 (A), SEGALEN, 2007 (B).

Esta planta tem sido popularmente utilizada em vários países para desordens do trato gastrointestinal e urinário, cólicas e processos dolorosos. Decocções da planta são usadas para “banhos medicinais” para fadiga e em processos inflamatórios, como artrite e reumatismo, enquanto que as infusões são empregadas no tratamento de hipertensão (PONGPRAYOON et al., 1989; SOUZA et al., 2000; LORENZI; MATOS, 2002).

O uso desta espécie em processos dolorosos associados à reação local após o contato com águas-marinhas venenosas teve seu efeito comprovado no estudo do

extrato metanólico, que revelou potentes e significantes propriedades antinociceptivas associadas às contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, ação esta equipotente a alguns fármacos analgésicos (SOUZA et al., 2000). A fração acetato de etila obtida a partir do extrato metanólico de *I. pes-caprae* também apresentou significativo efeito antinociceptivo, sendo que a análise fitoquímica com cromatografia levou ao isolamento de 15 compostos identificados por espectros de massa, infra-vermelho e ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  como: estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, glochidona, acetato de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina,  $\alpha$ - amirina,  $\beta$ -amirina, xantoxilina, 2,4-dihidroxi-6-metoxiacetofenona, ácido serícico, ácido betulínico, isoquercitrina, quercetina, ácido salicílico e solasodina (KROGH, 2001). Os resultados farmacológicos demonstraram que vários destes compostos apresentam a mesma atividade antinociceptiva observada com a fração acetato de etila (KROGH et al., 1999). Contrariamente, o uso popular desta planta no tratamento de distúrbios intestinais não foi comprovado pelo estudo da atividade antiespasmódica *in vitro*. Isto porque o extrato metanólico de *I. pes-caprae* não mostrou inibição da resposta contrátil induzida pela acetilcolina no íleo de porcos da Índia (CARDOZO et al., 2005).

Outros autores identificaram seis oligossacarídeos lipofílicos do ácido jalapínico a partir do extrato hexânico da *I. pes-caprae* (ESCOBEDO-MARTÍNEZ; PEREDA-MIRANDA, 2007), bem como dois novos ésteres do ácido quínico (1 - 2) e seis conhecidos compostos cafetaninos (3 - 8) obtidos da fração acetato de etila, ambos os oito com atividade inibitória da colagenase (TERAMACHI et al., 2005).

Recentemente foi apresentado que o extrato metanólico de *I. pes-caprae* estimulou o crescimento de células esplênicas murinas (ZANDONAI, 2007). Um estudo com células mononucleares humanas demonstrou que o extrato metanólico e a fração acetato de etila desta espécie apresentaram compostos que estimulam o crescimento celular (DE CESARO et al., 2008b). Na avaliação do efeito antitumoral *in vivo*, o extrato bruto de *I. pes-caprae* aumentou o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos concomitantemente com o aumento da hemopoiese (BREHMER, 2005). O efeito citotóxico contra linhagens de células humanas tumorais de nasofaringe, cólon, cervical e de ovário de seis compostos lipopentassacarídeos obtidos do extrato hexânico de *I. pes-caprae* sugerem que a pouca atividade citotóxica dos glicosídeos podem estar relacionadas com a habilidade de alteração das membranas celulares com conseqüente alteração no

fluxo de íons (PEREDA-MIRANDA; ESCALANTE-SANCHÉZ; ESCOBEDO-MARTÍNEZ, 2005). Zhao e colaboradores (2005) isolaram e caracterizaram um polissacarídeo com atividade imunoestimuladora, o (1-6)- $\alpha$ -D-glucan, que extraído das raízes de *I. batatas* promoveu a proliferação das células esplênicas de camundongos na presença e na ausência do mitógeno ConA.

A atividade antitumoral de outras espécies de *Ipomoea* mostrou que os glicosídeos obtidos do extrato acetato de etila de *I. stans* apresentaram citotoxicidade em células de carcinoma de cólon (HCT-15), ovariano (OVCAR-5) e cervical (UISO-SQC-1) (LÉON et al., 2004). Outro glicosídeo pentasacarídeo obtido das raízes de *I. murucoides* também mostrou atividade citotóxica em linhagem OVCAR (LÉON et al., 2005). Por fim, um pentasacarídeo lipofílico extraído das flores desta mesma espécie demonstrou atividade citotóxica seletiva para células de carcinoma da laringe (HEp-2), sem apresentar efeito sobre as células de carcinoma de nasofaringe (CHERIGO; PEREDA-MIRANDA, 2006).

Hueza e colaboradores (2003) avaliaram a atividade imunomodulatória de *I. carne*, planta tóxica encontrada nos países tropicais, inclusive no Brasil, e demonstraram que a fração aquosa promoveu aumento na atividade fagocitária e na liberação do peróxido de hidrogênio por macrófagos de ratos estimulados por lipopolissacáride (LPS). Estudos experimentais *in vitro* mostraram que a suainsonina, um constituinte da planta, apresenta propriedades imunomodulatórias com aumento na atividade das células *natural killer* murinas (HUMPHRIES et al., 1988). Os alcaloides suainsonina e calisteginas presentes na planta têm sido relacionados aos efeitos tóxicos (SCHWARZ et al., 2004), pois inibem a ação das manosidases e glicosidases causando desequilíbrio no complexo do metabolismo dos carboidratos (DEBALOGH et al., 1999; SCHWARZ et al., 2003). Uma extensa revisão sobre ocorrência e aplicações terapêuticas de alcaloides apresentou a suainsonina como um potencial agente antitumoral (WATSON et al., 2001).

### 3.3.2 Gênero *Vernonia*

*Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Figura 7), popularmente conhecida como Erva de São Simão, é um arbusto com até 3 metros de altura. A planta possui ramos numerosos e cilíndricos; folhas curto-pecioladas, ovaladas ou ovalo-lanceoladas;

acuminadas no ápice e longo arredondadas na base, inteiras ou crenado-dentadas, verdes e glabras na página superior; flores de corola purpúrea, reunidas em capítulos sésseis, unilaterais, 15-20 flores; fruto aquênio piloso turbinado, com papo brancacento e cerca de 30 cerdas. A espécie vegeta nas matas e terrenos abertos, sendo encontrada em todo o Brasil e em toda a América do Sul (CORRÊA, 1984).

Esta espécie pertence à família Asteraceae, que compreende 920 gêneros com cerca de 19.000 espécies. Esta família contém uma ampla variedade de constituintes químicos, como alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonoides neurotóxicos (BRUNETON, 1991). A diversidade destes compostos constitui importante fonte na pesquisa de substâncias com novas propriedades medicinais (PICMAN, 1986). Os terpenoides, denominados lactonas sesquiterpênicas, são os compostos característicos da família Asteraceae. As atividades biológicas atribuídas a estes compostos incluem a atividade antitumoral, antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica, de citoproteção gástrica e ainda efeitos neurotóxicos (BRUNETON, 1991).

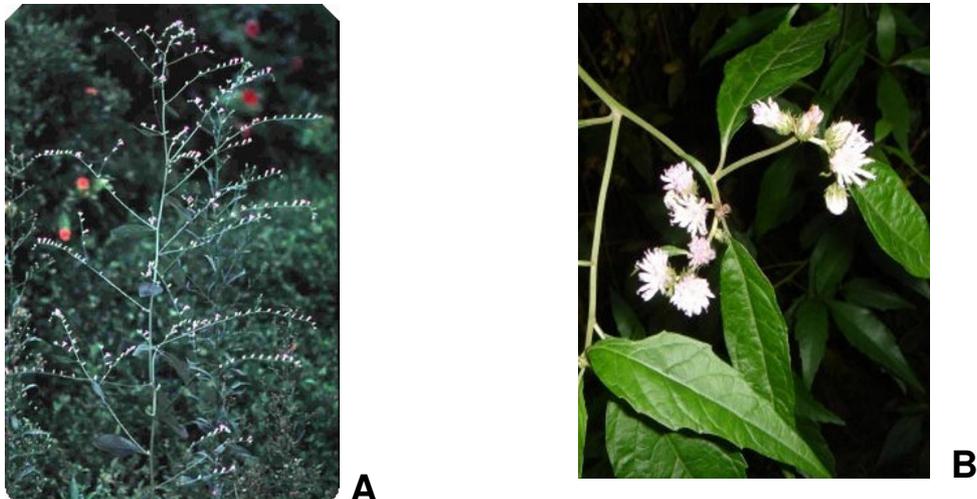


Figura 7. Fotos ilustrativas de *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers.

Fonte: BITTRICH; AMARAL, 2004 (A), MARTIN GARCIA, 2009 (B).

Os estudos fitoquímicos de *V. scorpioides* com técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  têm revelado a presença de compostos a partir da fração clorofórmio, como estigmasterol,  $\alpha$ -amirina e lupeol (MENDES, 2001). O óleo

essencial obtido das partes áreas desta espécie apresentou os seguintes constituintes: germacreno D, transcariofileno, limoneno, delta-cardineno, biciclogermacreno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -humuleno e aloararomadendreno (TOIGO et al., 2004). Ainda, Buskül (2007) isolou e caracterizou poliacetileno, cafeato de etila (5-octa-2,4,6-triiniil-5H-furan-2-ona) e uma mistura de lactonas sesquiterpênicas, que inclui hirsutinolídeos e glaucolídeo, além dos flavonoides luteolina e apigenina.

O extrato de *V. scorpioides* é popularmente conhecido por promover a cicatrização de úlceras varicosas e tem recomendado seu uso externo no tratamento de várias doenças de pele como alergias, parasitas, irritações e prurido (CABRERA; KLEIN, 1980). Um estudo verificou o efeito cicatrizante em feridas de cobaias promovido por um gel hidroalcoólico base com extrato de *V. scorpioides*, sendo a melhor cicatrização observada no grupo tratado atribuída à presença de tecido conjuntivo mais organizado e com tecido de granulação marginal (ALMEIDA; PALHANO, 2001). Contrariamente, a cicatrização de feridas excisional na pele de camundongos tratados diariamente com pomada contendo 20% de extrato etanólico de *V. scorpioides* não mostrou inibição do recrutamento, da estimulação de células inflamatórias e do processo da resposta, favorecendo o aumento das lesões na fase aguda da cicatrização (KREUGER et al., 2005).

Os extratos clorofórmicos e hexânicos obtidos a partir do caule de *V. scorpioides* mostraram maior atividade antifúngica que aqueles obtidos de folhas verdes da planta (FREIRE et al., 1996). Nos ensaios microbiológicos, Mendes (2001) mostrou que o extrato metanólico de *V. scorpioides* obtido a partir das folhas da planta não inibiu o crescimento dos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*. Da mesma forma, Campos (2001) também não verificou atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas, enquanto que as frações hexano e diclorometano apresentaram ação antibacteriana e antifúngica. O mesmo autor demonstrou ainda atividade antibacteriana do extrato etanólico de caules da planta para *S. aureus*.

O extrato hidroalcoólico obtido a partir de folhas e flores desta espécie administrado por via intraperitoneal em camundongos promoveu a inibição de processos inflamatórios agudos em modelos de edema *in vivo* induzido por carragenina e histamina (DREUX, 2005; RAUH, 2008). A administração oral desse

extrato também diminuiu a migração de neutrófilos e de leucócitos mononucleares em modelo de peritonite induzida por carragenina (DREUX, 2005).

Recentemente foi revelado pelo grupo de pesquisadores do NIQFAR – UNIVALI, que o extrato metanólico de *V. scorpioides* inibiu a proliferação de células esplênicas murinas induzida pela PHA (MENDES et al., 2007) e, quando incubado isoladamente, também teve efeito inibidor/citotóxico em concentrações inferiores a 100 µg/mL (ZANDONAI, 2007). Em células mononucleares humanas foi demonstrado que o extrato metanólico e as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa desta espécie inibiram o crescimento celular, sugerindo que a fração diclorometano possui maior concentração dos compostos responsáveis pela atividade (DE CESARO et al., 2008a). Outro grupo de pesquisa avaliou os polissacarídeos pectina e arabinogalactona extraídos das raízes de *V. kotschyana* na proliferação de células esplênicas murinas, demonstrando que o primeiro não interferiu na proliferação de células esplênicas enquanto que o segundo induziu a proliferação destas células (NERGARD et al, 2005).

Ensaio biológico com o extrato metanólico e com a fração clorofórmio de *V. scorpioides* apresentaram atividade imunossupressora com inibição do número de células secretoras de anticorpos IgM em animais imunizados com antígenos T dependentes. O acetil lupeol isolado a partir da fração clorofórmio desta espécie apresentou atividade antitumoral, inibindo o desenvolvimento do tumor de Erlich e inibindo a rejeição aguda em transplantes alogênicos de pele em camundongos (MENDES, 2001).

Estudos recentes revelaram propriedades antitumorais de *V. scorpioides*. A fração diclorometano mostrou inibição do crescimento tumor ascítico de Ehrlich em camundongos (PAGNO et al., 2006), enquanto que algumas lactonas sesquiterpênicas isoladas a partir da fração diclorometano, como hirsutinólídeos e glaucolídeo, apresentaram atividade citotóxica *in vitro* sobre as linhas celulares Hela, L929 e B16F10, sendo essa ação decorrente do processo de necrose e apoptose (BUSKÜL, 2007).

Outras espécies de *Vernonia* estudadas quanto à atividade antitumoral têm comprovada a presença de compostos citotóxicos no gênero. Williams e colaboradores (2005) demonstraram que o extrato etanólico de *V. pachyclada* apresentou moderada citotoxicidade frente às células de câncer de ovário humano (A2780), o que levou ao isolamento de três novas lactonas sesquiterpênicas tendo

uma delas, o glaucolídeo M, atividade citotóxica comprovada na mesma linhagem de células tumorais. Outras três lactonas sesquiterpênicas isoladas de *V. chinensis* exibiram potente atividade citotóxica frente a células de tumor linfóide de camundongo (P388) e células de adenocarcinoma de pulmão (A549) (CHEN et al., 2005). Por fim, Huo e colaboradores (2008) verificaram potente atividade citotóxica de cinco sesquiterpenoides obtidos a partir das partes aéreas de *V. bockiana* em células tumorais (P388).

Considerando que um estudo recente revelou resultados significantes e promissores no modelo de proliferação de células esplênicas murinas para *I. pes-caprae* e *V. scorpioides*, a primeira estimulando o crescimento celular e a *segunda* inibindo a proliferação celular induzida pela PHA e com possível efeito citotóxico (ZANDONAI, 2007), e que estas duas espécies não apresentam dados na literatura acerca do efeito das frações na proliferação celular *in vitro*, o presente estudo das frações obtidas a partir dos extratos metanólicos destas espécies se propõe a auxiliar na busca biomonitorada da(s) substância(s) responsável pela atividade, bem como avaliar a atividade citotóxica destas frações em linhagens leucêmicas humanas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tipo e local de estudo

Estudo prospectivo experimental *in vitro* controlado, com ensaios laboratoriais de amostras biológicas. Os testes de proliferação celular foram realizados no Laboratório de Farmacologia *in vitro* do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes.

### 4.2 Material vegetal

O material botânico e extratos foram previamente obtidos e caracterizados pelos colaboradores, Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho e Prof<sup>a</sup>. Dra. Maique Weber Biavatti.

Resumidamente, as partes aéreas de *I. pes-caprae* foram coletadas na Praia da Esplanada, na cidade de Jaguaruna/SC, e identificadas pelo Dr. Ademir Reis (Departamento de Botânica, UFSC). Uma exsicata foi depositada no Herbário Barbosa Rodrigues em Itajaí-SC sob número V.C. Filho 009. As partes aéreas de *V. scorpioides* foram coletadas na praia do Molhes, na cidade de Navegantes/SC, e identificadas pela Dra. Ana Cláudia Araújo. A exsicata da planta foi depositada no mesmo Herbário sob especificação Maique W. Biavatti 11.

A partir do material vegetal seco ou fresco foi preparado um extrato alcoólico utilizando o metanol como líquido extrator, mediante maceração durante 7 ou 10 dias em recipiente fechado à temperatura ambiente. O material filtrado e concentrado, através da evaporação à pressão, constituiu o extrato metanólico da planta (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). A este extrato foi adicionado 1/3 do volume concentrado em água para então ser submetido à partição líquido-líquido através de um funil de separação, com solventes de polaridade crescente sendo:

clorofórmio e acetato de etila para *I. pes-caprae* e hexano, diclorometano e acetato de etila para *V. scorpioides*, procurando assim a obtenção de uma semi-purificação dos compostos de acordo com a polaridade. Este processo de extração foi repetido três vezes para cada solvente e as frações obtidas reduzidas à secura até eliminação do solvente, correspondendo, respectivamente, às frações semi-puras de clorofórmio e acetato de etila para *I. pes-caprae* e hexano, diclorometano e acetato de etila para *V. scorpioides* (Figura 8). A investigação da composição das frações, previamente realizada para as duas espécies, empregou métodos espectroscópicos como ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (KROGH, 2001; BUSKÜL, 2007).

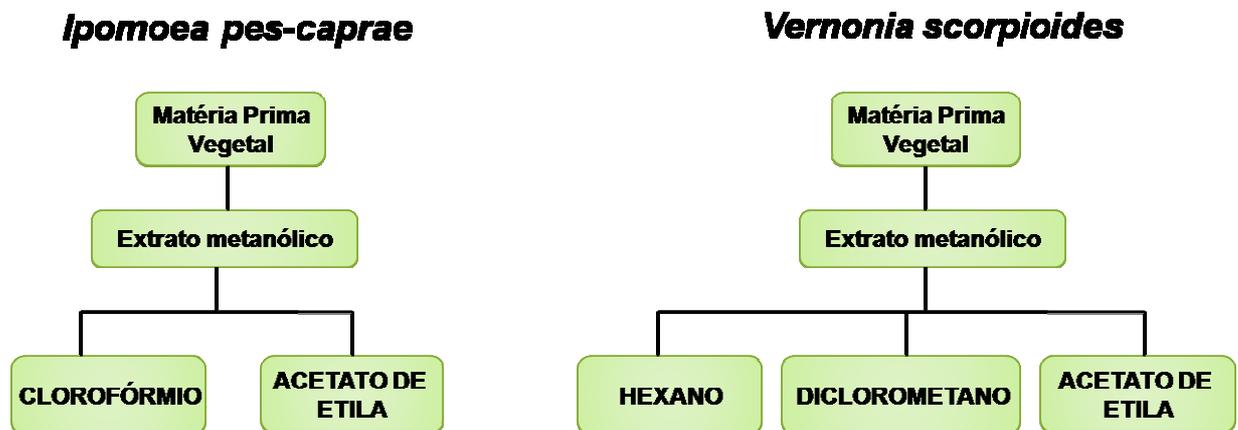


Figura 8. Fluxograma do processo de extração dos extratos metanólicos e frações de *Ipomoea pes-caprae* e *Vernonia scorpioides*.

Fonte: Autor, (2008)

O teor de umidade presente no material botânico com limitação de temperatura em 110 °C foi analisado em balança de infra-vermelho (LJ16 Moisture Analyser) no Laboratório de Análise e Produção de Medicamentos (LAPAM) da UNIVALI. A umidade do extrato metanólico e frações de *I. pes-caprae* foi inferior a 1,74%, enquanto que a umidade do extrato metanólico e frações de *V. scorpioides* foi inferior a 0,81%.

Para a avaliação da proliferação celular as frações e extratos metanólicos de *I. pes-caprae* e *V. scorpioides* foram solubilizados em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ), obtendo concentração de 1mg/mL em meio de cultura D'MEM modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma Inc., Sto. Loius, MO, EUA). Estes preparados foram esterilizados por meio de filtração a 0,22  $\mu$ m, aliquotados e armazenados a -20 °C ao abrigo da luz até o momento do uso.

Para a avaliação da atividade citotóxica as frações e extratos metanólicos de *I. pes-caprae* e de *V. scorpioides* foram solubilizados com DMSO (Sigma) na concentração de 20 mg/mL, aliquotados e armazenados a -20 °C ao abrigo da luz até o momento do uso.

### **4.3 Proliferação celular *in vitro***

Foram utilizados 50 camundongos Swiss obtidos junto ao Biotério Central da UNIVALI, todos machos, com peso entre 20 a 30 g, mantidos com ciclo claro/escuro de 12 horas e aclimatados a temperatura de  $22 \pm 2$  °C, tratados com água e ração *ad libitum*. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVALI sob número 429/07. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os Princípios para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Animais, que possuem por objetivo evitar o uso excessivo de animais, incentivando o uso e cuidado adequado, antes, durante e após a experimentação, evitando assim ao máximo o sofrimento dos animais (GOLDIM, 1997).

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido da retirada cirúrgica do baço. As células esplênicas foram obtidas assepticamente por rompimento mecânico da cápsula do baço em solução salina tamponada estéril. Após centrifugação de 10 minutos a 1000 r.p.m., as hemácias presentes no sedimento foram lisadas em choque hipotônico com água destilada estéril, seguido da reconstituição da isotonicidade com solução salina 3,5%. A suspensão celular foi centrifugada novamente e a concentração celular determinada pela contagem em câmara de Neubauer, simultaneamente à verificação da viabilidade celular pela exclusão com azul de Tripán 0,4% (Sigma). Foram utilizadas somente suspensões celulares com viabilidade superior a 90%. Para a obtenção do número suficiente de

células para a realização dos experimentos os procedimentos foram realizados com células obtidas de baço de diferentes animais.

A proliferação celular, realizada de acordo Krueger e colaboradores (2005) e Zandonai (2007), utilizaram microplacas de 96 poços, de fundo chato, estéreis e com tampa (TTP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), e meio de cultura D'MEM (Sigma Inc.) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP), 2% de bicarbonato de sódio a 10% (Dinâmica, São Paulo, SP), 1% de L-glutamina a 200 mM (Sigma), 1% de HEPES a 10mM (Sigma) e 110 mg/mL de piruvato de sódio (Vetec).

Inicialmente a metodologia foi adaptada às condições do Laboratório de Farmacologia *in vitro* do Centro de Ciências da Saúde da UNIVALI. Nesta etapa foram empregadas células nas concentrações de 100.000 a 250.000 células/poço frente ao mitógeno PHA (Sigma, de 5 µg/mL a 10 µg/mL), para a definição da concentração celular ideal para o ensaio. As microplacas foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas (YASNI et al., 1993; ROSEGHINI et al., 2006).

Após a adequação da metodologia os procedimentos experimentais na cultura celular foram realizados com a incubação de células (150.000 células/poço) e extratos metanólicos ou frações de *I. pes-caprae* e de *V. scorpioides* (10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL), isoladas e simultaneamente a PHA (5 µg/mL) ou DMSO (10%), a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas.

Somente os experimentos cujos controles internos do teste comprovaram ausência de contaminação nos componentes do cultivo foram utilizados, como meio de cultura, extratos metanólicos e frações, células, PHA e DMSO. Outros quatro controles foram realizados para a interpretação dos resultados: controle dos extratos metanólicos e frações, que permitiu verificar a intensidade de cor residual dos mesmos; controle negativo de proliferação celular, que correspondeu ao crescimento basal das células mantidas isoladamente no cultivo celular; controle positivo de proliferação celular, definido pelo estímulo ao crescimento celular observado frente à PHA (5 µg/mL); e controle positivo de citotoxicidade, realizado pela exposição das células ao DMSO a 10%.

A revelação da proliferação celular foi realizada pela redução do MTT (Sigma), com a adição de 10 µL de MTT a 5 mg/mL em cloreto de sódio 0,9% a cada

poço da cultura celular, três horas antes do término do período de incubação. Após o término do período de incubação foi adicionado a cada poço 100 µL de DMSO para a dissolução dos cristais formados pela redução do MTT pelas células viáveis (BETANCUR-GALVIS et al., 1999; ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003). A densidade óptica (DO) de cada poço foi imediatamente determinada em espectrofotômetro de microplacas a 570 nm (Expert Plus, Microplate Reader G020 150, Eugendorf, Salzburg, Áustria) (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

Todos os ensaios foram realizados em quaduplicata. Os resultados em DO obtidos na revelação da proliferação celular dos quatro experimentos independentes foram analisados após eliminação do *background* das células (controle negativo) de cada experimento, empregando como indicador a percentagem de proliferação [% proliferação = 100 x (DO teste - DO controle negativo) / DO controle negativo]. A percentagem de proliferação obtida corresponde à viabilidade celular e ao número de células viáveis, correspondendo, no caso de um resultado positivo, à proliferação celular induzida pelo composto adicionado ao cultivo celular (MANOSROI; SARAPHANCHOTIWITTHAYA; MANOSROI, 2003; RISCO et al., 2003). Contrariamente, um resultado negativo será indicativo da lise celular promovida pelo composto adicionado à cultura, ou seja, corresponderá à citotoxicidade do composto (XU et al., 1999; ESTEVES-SOUZA et al., 2002; SUNILA; KUTTAN, 2004).

#### **4.4 Atividade citotóxica *in vitro***

As células Jurkat, HL60 e HL60-bcl2 foram cultivadas em garrafas T75 (TPP) mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Sigma), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma), 1% de L-glutamina (Sigma), 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, EUA). As culturas celulares foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os experimentos foram realizados de acordo com Monks e colaboradores (1991). As células Jurkat, HL60 e HL60-bcl2 foram plaqueadas (100 µL) a 50.000 células/poço em microplacas de 96 poços (TTP) junto a 80 µL de meio de cultura RPMI e mantidas por 24 horas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após estas 24 horas foi adicionado 20 µL dos extratos metanólicos ou frações de *I. pes-caprae* e de *V.*

*scorpioides* (1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL). Após 48 horas de incubação a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) e a placa mantida mais 4 horas em estufa a 37 °C e com 5% CO<sub>2</sub>. Ao término desse período, o sobrenadante foi retirado, e para a solubilização dos cristais formados pela redução do MTT foi adicionado 200 µL de isopropanol (0,04 M em ácido clorídrico). A DO de cada poço foi imediatamente determinada em espectrofotômetro de microplacas a 590 nm.

As células mantidas em meio RPMI suplementado foram utilizadas como controle celular. O controle positivo de citotoxicidade foi etoposídeo (Sigma) nas concentrações de 1 µM, 10 µM e 100 µM (STAHNKE et al., 2001). A concentração de 1 µM de etoposídeo não foi eficiente como droga antitumoral nas três linhagens de células, enquanto que as outras duas concentrações apresentaram o efeito desejado e de forma semelhante ( $p > 0,05$ , dados não apresentados), tendo sido definida a menor concentração (10 µM) como a ideal para os ensaios de citotoxicidade. O controle de solvente empregado foi o próprio DMSO a 0,5%. Uma avaliação prévia do DMSO em três diferentes concentrações (0,5%, 0,05%, 0,005%) mostrou não haver diferença significativa entre elas ( $p > 0,05$ , dados não apresentados), tendo sido utilizada a média de todas as leituras das absorbâncias obtidas com DMSO na análise dos resultados. Ainda na avaliação prévia, os resultados obtidos com as três linhagens celulares mostram leituras semelhantes entre DMSO e controle celular ( $p > 0,05$ , dados não apresentados), indicando que o DMSO não apresenta efeito citotóxico sobre as células mantidas no cultivo e, que o emprego deste como solvente dos extratos e frações, não é fator interferente nos resultados obtidos no cultivo celular.

Os ensaios para a avaliação da atividade citotóxica foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes, e os resultados expressos em percentagem de proliferação [% proliferação =  $100 \times (\text{DO células tratadas}) / \text{DO controle DMSO}$ ] como uma medida de viabilidade celular na presença dos compostos testados (MONKS et al., 1991).

#### **4.5 Análise estatística**

Os resultados obtidos na proliferação celular foram submetidos à análise

estatística Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, enquanto que os resultados obtidos na atividade citotóxica foram submetidos ao Teste t não-pareado, ambos de forma a demonstrar a significância dos resultados e fundamentar as conclusões obtidas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fármacos que modulam a ativação do sistema imune eram conhecidos até recentemente como imunossupressores e tiveram o uso e o desenvolvimento ampliado devido aos transplantes e ao avanço no conhecimento da Imunologia Clínica (LIMA, 2007). Atualmente a terapia imunológica envolve o uso de imunomoduladores, fármacos que podem exacerbar ou reduzir a resposta imune, de uso tópico e ou sistêmico, para tratamento de doenças infecciosas, hipersensibilidades, autoimunidades, imunodeficiências, além da clássica utilização em transplantes (LIMA, 2004). A maioria dos imunomoduladores surgiu de maneira empírica, mas o desenvolvimento da compreensão da fisiopatologia do sistema imune tem propiciado o desenvolvimento de novos imunomoduladores e a identificação do mecanismo de ação dos mesmos, uma vez que estes fármacos podem estimular os diversos componentes do sistema imunológico isolada ou simultaneamente, bem como ativar uma resposta enquanto suprime outra (SILVERSTEIN, 1989).

Desta forma, a identificação e estudo de substâncias que atuem junto aos diferentes componentes e mecanismos do sistema imunológico e que objetiva a manutenção da integridade do organismo tem sido foco de estudo de vários grupos de pesquisadores (PANDIMA DEVI et al., 2003). O teste de proliferação linfocitária é um dos modelos *in vitro* que avalia as respostas dos linfócitos em contato com antígenos específicos ou mitógenos. A ativação da resposta imune promove a proliferação celular com o aumento do número de células na cultura em um período definido (ROCHA; GORESCO; BELTRAME, 2007), e pode ser identificada pela redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial das células vivas (MOSMANN, 1983).

Usualmente, os estudos de produtos naturais envolvem ensaios de atividade biológica e farmacológica para a triagem dos extratos obtidos das plantas, com subsequente avaliação das frações e das substâncias isoladas responsáveis pela atividade observada (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Vários são os aspectos que devem ser considerados na escolha da planta a ser estudada, sendo as informações da medicina popular um dos principais aspectos a ser observado (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

Assim, a partir do uso popular e de estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisadores do NIQFAR- UNIVALI, foram selecionados para este trabalho as espécies *I. pes-caprae* e *V. scorpioides*. A identificação do efeito imunomodulador dos extratos metanólicos e frações destas duas plantas no teste de linfoproliferação somente foi realizada após a adequação da metodologia quanto ao número de células e a concentração do mitógeno. Para tanto, foram ensaiadas células esplênicas murinas de 100.000 a 250.000 células/poço frente ao estímulo mitogênico da PHA (5 µg/mL a 10 µg/mL). Os resultados obtidos mostraram maior crescimento quando utilizadas 150.000 células/poço e 5 µg/mL de PHA, definindo estas como concentrações ideais para a avaliação da proliferação de células esplênicas. A ação mitogênica exacerbada nas concentrações superiores a 5 µg/mL sugere inibição do crescimento celular ou mesmo morte celular, como observados nos valores negativos de proliferação encontrados (Figura 9).

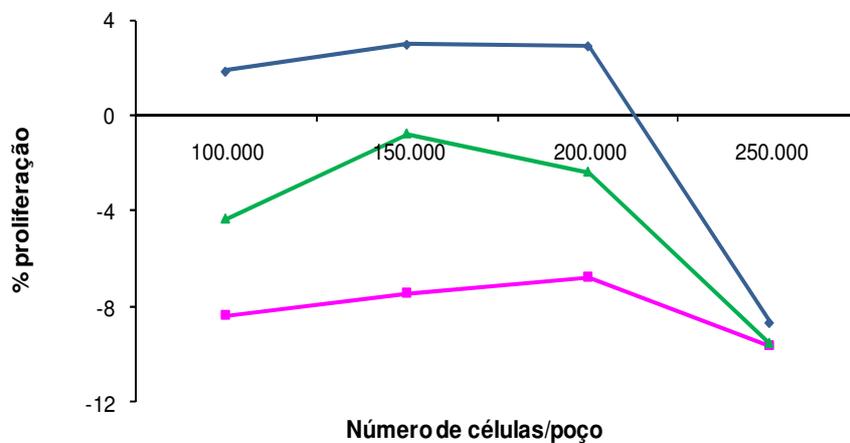


Figura 9. Proliferação celular *in vitro* de células esplênicas murinas frente à fitohemaglutinina (5 µg/mL) em incubação a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas, reveladas pela redução do azul de tetrazólio (MTT).

--- PHA 5 µg/mL; --- PHA 7,5 µg/mL; --- PHA 10 µg/mL.

## 5.1 *Ipomoea pes-caprae*

Zandonai (2007) demonstrou que o extrato metanólico de *I. pes-caprae* estimulou o crescimento de células esplênicas murinas e sugeriu a continuidade do estudo biomonitorado com as frações do mesmo. Desta forma, foram avaliados aqui o extrato metanólico e as frações clorofórmio e acetato de etila desta espécie, com vistas a determinar a fração cujos constituintes foram responsáveis pela atividade imunoestimuladora. Os resultados obtidos na proliferação de células esplênicas murinas frente ao extrato metanólico de *I. pes-caprae*, isoladamente ou simultaneamente à PHA ou DMSO, estão apresentados na Figura 10. As quatro concentrações avaliadas mostraram diferença significativa entre si quando o extrato foi incubado simultaneamente à PHA e ao DMSO ( $p < 0,001$ ), embora com correlação dose-resposta somente nesta última condição de cultivo.

O extrato metanólico de *I. pes-caprae* induziu a proliferação de células esplênicas murinas de 5,0% a 10,1% (Figura 10A). Apenas as concentrações de 10  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram estímulo ao crescimento celular inferior ao controle positivo de proliferação celular (11,4%,  $p < 0,05$ ). Contrariamente, as quatro concentrações do extrato avaliadas mostraram diferença significativa do controle positivo de citotoxicidade (-15,2%) ( $p < 0,01$ ). Estes resultados indicam não haver efeito citotóxico do extrato frente a estas células, e que o mesmo possui efeito imunoestimulador sobre as células esplênicas murinas.

O mesmo extrato metanólico de *I. pes-caprae* incubado junto à PHA no cultivo celular apresentou proliferação de -7,1% a 7,3% (Figura 10B). Este valor negativo corresponde à inibição do estímulo mitogênico da PHA, efeito este promovido pelo extrato na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,001$ ). As concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$  e 200  $\mu\text{g/mL}$ , embora tenham mantido o estímulo ao crescimento celular, foram significativamente inferiores ao controle positivo de proliferação celular ( $p < 0,01$ ). Por fim, o extrato incubado junto ao DMSO demonstrou que o mesmo inibe parcialmente e de maneira dose-dependente a atividade citotóxica do solvente e significativamente nas concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$  e 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 10C).

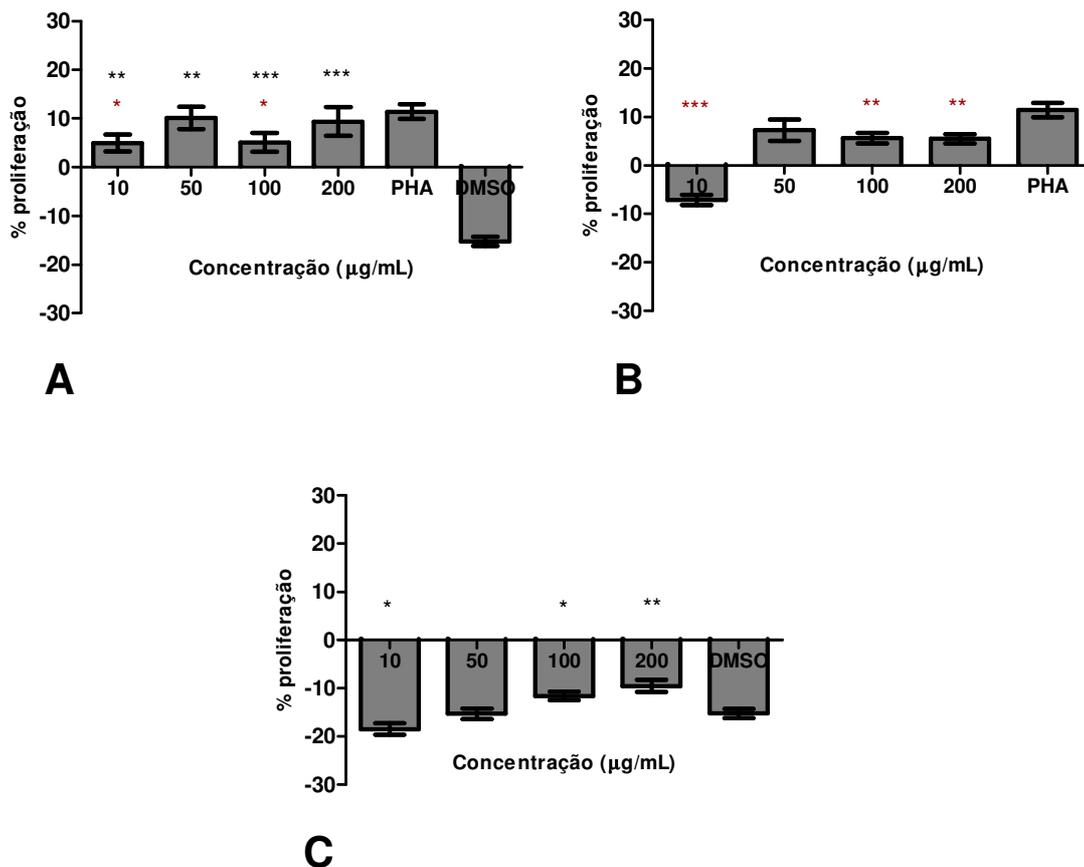


Figura 10. Proliferação de células esplênicas murinas *in vitro* frente ao extrato metanólico de *I. pes-caprae* (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam média e erro padrão da média de quatro experimentos realizados em quadruplicata; PHA: fitohemaglutinina, controle positivo de proliferação celular; DMSO: dimetilsulfóxido, controle positivo de citotoxicidade; \*vermelho: comparação com PHA; \*preto: comparação com DMSO; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Estudos anteriores com o extrato metanólico de *I. pes-caprae* também revelaram indução da proliferação de células esplênicas murinas frente à PHA e ao *pokeweed mitogen*, sugerindo que linfócitos T e linfócitos B são ativados pelos componentes presentes no extrato da planta (ZANDONAI, 2007; COELHO; FERREIRA, 2007). Em outros estudos recentes, este mesmo extrato aumentou a proliferação de células mononucleares humanas, confirmando a atividade imunoestimuladora dos componentes da planta (DE CESARO et al., 2008b; PHILIPPI, 2008).

A *I. pes-caprae* apresenta na sua composição esteroides, terpenoides, alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas (SOUZA et al., 2000), com constituintes como  $\beta$ -damascenona,  $\epsilon$ -fítol, ácido betulínico, triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, acetatos, isoquercitinas (PONGPRAYOON et al., 1992; SOUZA et al., 2000) e isoprenoides (KROGH et al., 1999). Alguns destes componentes têm sido relacionados com atividade imunoestimuladora. Os terpenoides e alcaloides apresentam ação imunoestimuladora sobre a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* (WAGNER, 1990), enquanto que as saponinas potencializam intensamente a resposta imune (FLECK et al., 2006) a ponto de serem utilizadas como coadjuvantes em vacinas (COSTA et al., 2005; RAJPUT et al., 2007). Os compostos fenólicos também têm sido relacionados ao aumento na proliferação de linfócitos murinos (FISCHER et al., 2007).

Contrariamente, outros compostos presentes nesta espécie têm sido relacionados à atividade imunossupressora da proliferação de células esplênicas. Os flavonoides apresentam atividade imunossupressora por inibir a proliferação de células esplênicas murinas (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008) e, de forma similar, os triterpenoides demonstram efeito imunossupressor na proliferação de células T murinas (GAO et al., 2008). Considerando que o extrato desta espécie apresentou estímulo da proliferação de leucócitos na medula óssea de camundongos (BREHMER, 2005), bem como indução dose-dependente na proliferação de células esplênicas murinas (COELHO et al., 2007; COELHO; FERREIRA, 2007; ZANDONAI, 2007) e de células mononucleares humanas (DE CESARO et al., 2008b; PHILIPPI, 2008), é possível inferir que a associação dos compostos do extrato metanólico apresenta a imunoestimulação como atividade biológica.

Outras espécies de *Ipomoea* também vêm sendo pesquisadas quanto à atividade imunomoduladora no modelo de proliferação de células esplênicas. A *I. batata*, popularmente conhecida como batata-doce, forneceu um polissacarídeo que apresentou estímulo à proliferação de células esplênicas de camundongos (ZHAO et al., 2005), em concordância com alguns relatos do efeito imunoestimulador dos polissacarídeos (PARK; LAI; KIM, 2004; ZHAO et al., 2005).

Muitos produtos naturais vêm mostrando atividades biológicas e farmacológicas, alguns sendo utilizados como agentes quimioterápicos, como a vinblastina, vincristina, etoposídeo, teniposídeo e paclitaxel (CRAGG; NEWMAN, 2007). A utilização de plantas medicinais para a obtenção de novos fármacos com

efeito antitumoral também tem sido um importante caminho para descoberta de novas aplicações clínicas na medicina moderna (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Assim, o extrato metanólico de *I. pes-caprae* foi avaliado com vistas a identificar a presença de atividade citotóxica em três linhagens leucêmicas humanas, células Jurkat, HL60 e HL60-bcl2.

O extrato metanólico de *I. pes-caprae* não apresentou atividade citotóxica nas linhagens celulares Jurkat, HL60 e HL60-bcl2 nas concentrações avaliadas de 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL ( $p > 0,05$ ) (Figura 11). Em relação ao controle com DMSO, utilizado como controle do solvente empregado na solubilização do extrato, os valores de proliferação frente ao extrato variaram de 80,6% a 98,0% para células Jurkat (Figura 11A), de 90,0% a 110,6% para células HL60 (Figura 11B) e de 88,5% a 104,8% para células HL60-bcl2 (Figura 11C). As três linhagens celulares estudadas frente ao extrato mostraram resultados similares aos obtidos com DMSO e ao controle celular ( $p > 0,05$ ) e, conseqüentemente, superiores ao etoposídeo ( $p < 0,05$ ), confirmando que o extrato metanólico não apresenta atividade citotóxica nestas linhagens.

Embora não tenha sido observada atividade citotóxica nas linhagens aqui testadas, alguns constituintes presentes na *I. pes-caprae* apresentam relatos na literatura quanto a atividade citotóxica. Como exemplo, o ácido betulínico inibiu o crescimento de células tumorais de vários tecidos devido à diminuição da motilidade e morte celular por apoptose pela diminuição da expressão da bcl2 (RZESKI et al., 2006) e pelo aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (FULDA, 2009). A quercetina também foi citotóxica frente às linhagens de células leucêmicas humanas Jurkat, HL60, Molt (leucemia linfoblástica aguda de células T), Raji (linfoma de Burkii) e U937 (linfoma histiocítico) (JOSIPOVIC; ORSOLIC, 2008).

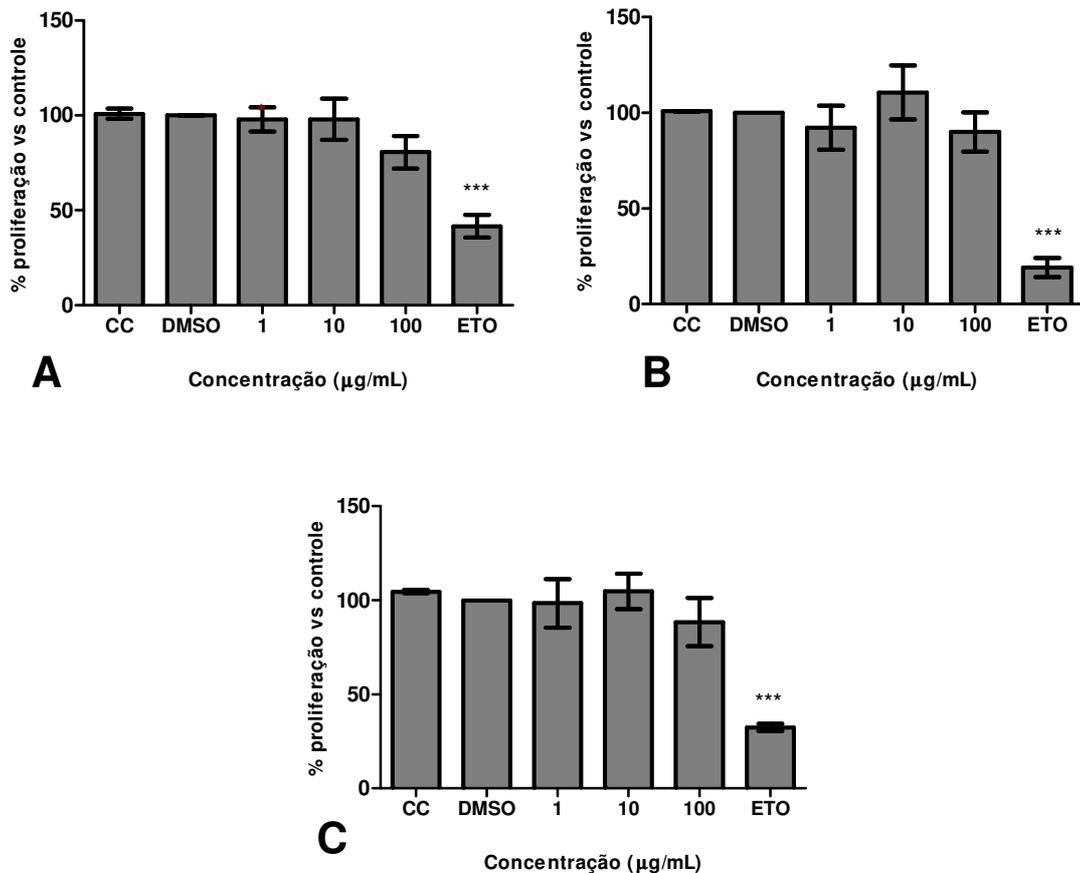


Figura 11. Atividade citotóxica *in vitro* do extrato metanólico de *I. pes-caprae* (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam a média e o erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata; CC: controle celular; DMSO (dimetilsulfóxido ≤0,5%): controle negativo; ETO (etoposídeo a 10 µM): controle positivo; Comparação com DMSO: \*\*\* p<0,001.

A atividade citotóxica do ácido betulínico e da quercetina descrita na literatura (RZESKI et al., 2006; JOSIPOVIC; ORSOLIC, 2008; FULDA, 2009) parece ter sido inibida, no presente estudo, pela associação destes com os demais compostos presentes no extrato metanólico da *I. pes-caprae*, mesmo porque estes compostos não são majoritários na *I. pes-caprae* (KROGH, 2001). Em concordância com esta hipótese, a literatura relata que os compostos β-sitosterol e estigmasterol não mostraram atividade citotóxica em células de adenocarcinoma de pulmão (A549) e de próstata (LNCaP) (LI; CHEN; LO, 2008).

Considerando que o extrato metanólico de *I. pes-caprae* estimulou o crescimento celular no modelo de proliferação *in vitro* de células esplênicas murinas e que em células leucêmicas humanas Jurkat, HL60 e HL60-bcl2 não houve efeito sobre a proliferação celular, é possível sugerir que a associação dos compostos presentes no extrato da planta avaliado apresentam atividade imunoestimuladora sobre as células do sistema imune murino, sem apresentar efeito citotóxico nessas linhagens tumorais. A imunoestimulação de células normais pelo extrato metanólico dessa espécie foi previamente identificada em estudos realizados pelo grupo de pesquisa NIQFAR (Núcleo de Investigação de Química Farmacêutica) - UNIVALI, em modelos *in vitro* murino (COELHO; FERREIRA, 2007; ZANDONAI, 2007) e humano (DE CESARO et al., 2008b; PHILIPPI, 2008).

A continuidade do estudo biomonitorado avaliou as frações de acordo com a polaridade crescente das mesmas. Assim, a primeira fração estudada foi a clorofórmio, obtida a partir do extrato metanólico de *I. pes-caprae*, que induziu a proliferação das células esplênicas murinas de -4,8% a 4,7% (Figura 12A). As células tratadas com essa fração mostraram percentagens de crescimento de -5,7% a 8,7% quando incubadas junto a PHA (Figura 12B) e de -12,2% a -16,5% quando incubadas com DMSO (Figura 12C).

Embora as quatro concentrações da fração clorofórmio tenham mostrado diferença significativa quando a mesma foi incubada isoladamente no cultivo celular ( $p=0,001$ ), não houve relação dose-resposta no efeito observado sobre a proliferação celular (Figura 12A). As concentrações inferiores a 200  $\mu\text{g/mL}$  nesta condição de cultivo promoveram inibição da proliferação celular significativamente inferior ao controle positivo de proliferação celular (11,4%,  $p<0,001$ ) e de forma semelhante ao controle positivo de citotoxicidade (-15,2%,  $p<0,001$ ). Este efeito sobre a proliferação celular também foi observado quando a fração clorofórmio em concentrações inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$  foi incubada junto à PHA (Figura 12B) e em todas as quatro concentrações da fração testadas junto ao DMSO no cultivo celular (Figura 12C).

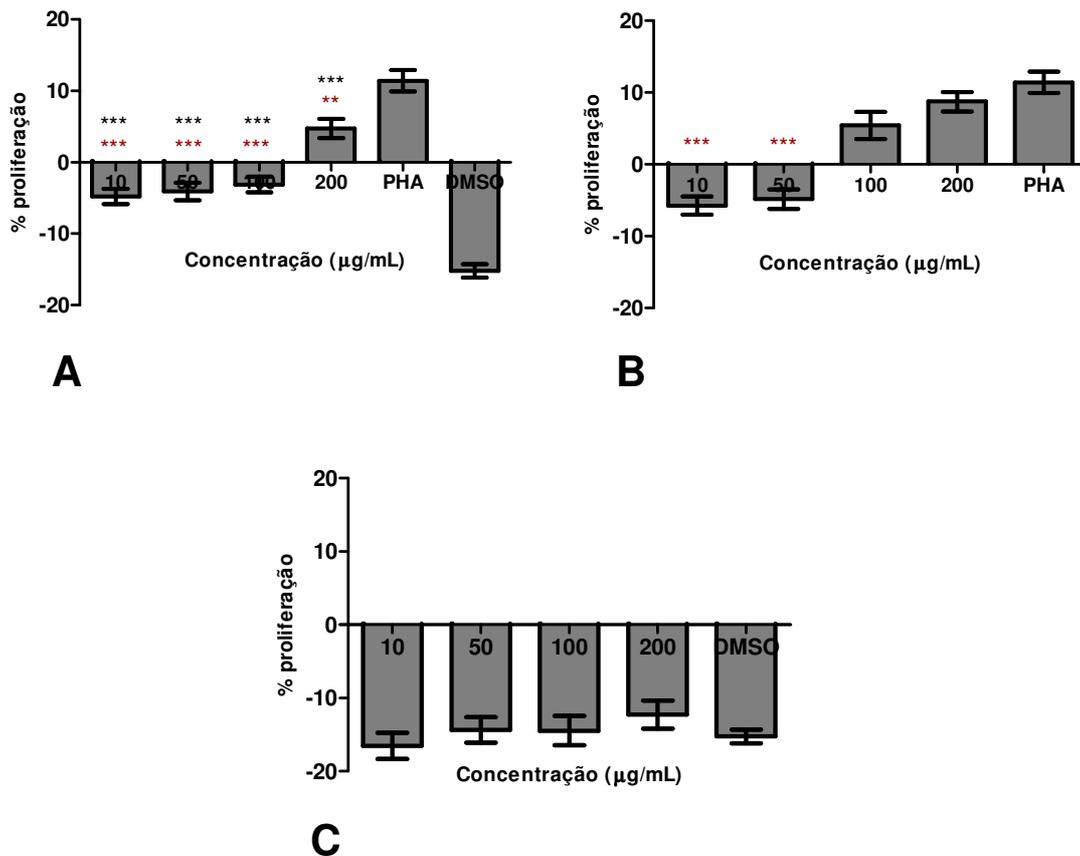


Figura 12. Proliferação de células esplênicas murinas *in vitro* frente à fração clorofórmio do extrato metanólico de *I. pes-caprae* (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam média e erro padrão da média de quatro experimentos realizados em quadruplicata; PHA: fitohemaglutinina, controle positivo de proliferação celular; DMSO: dimetilsulfóxido, controle positivo de citotoxicidade; \*vermelho: comparação com PHA; \*preto: comparação com DMSO; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Os resultados obtidos com as células esplênicas murinas sugerem que os compostos presentes na fração clorofórmio de *I. pes-caprae* possuem atividade imunossupressora. Recentemente, o grupo de pesquisa NIQFAR-UNIVALI demonstrou também atividade imunossupressora em células mononucleares humanas para esta mesma fração (DE CESARO et al., 2008b).

Considerando que a extração com clorofórmio possibilita o isolamento de compostos mais apolares em relação ao solvente acetato de etila e que a *I. pes-caprae* apresenta na sua composição esteroides, terpenoides, alcaloides,

flavonoides, taninos e saponinas (SOUZA et al., 2000), a fração clorofórmio provavelmente inclui a classe dos flavonoides e terpenoides. Estas duas classes de compostos têm sido relatadas na literatura como inibidores da proliferação de células esplênicas murinas (GAO et al., 2008; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008).

A fração clorofórmio de *I. pes-caprae* avaliada nas concentrações de 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL nos testes de atividade citotóxica demonstraram valores de proliferação de 15,1% a 102,0% com células Jurkat (Figura 13A), de 27,2% a 117,8% com células HL60 (Figura 13B) e de 35,8% a 123,0% com células HL60-bcl2 (Figura 13C). As concentrações de 1 µg/mL e 10 µg/mL mostraram valores semelhantes ou superiores ao controle DMSO, não evidenciando citotoxicidade frente às três linhagens celulares testadas. Contudo, a concentração de 100 µg/mL desta fração clorofórmio inibiu a proliferação celular tanto nas células Jurkat ( $p < 0,001$ ) como nas células HL60 ( $p < 0,01$ ) e HL60-bcl2 ( $p < 0,001$ ), sendo a citotoxicidade nas células Jurkat mais ativa que o próprio controle etoposídeo ( $p < 0,05$ ).

A atividade citotóxica verificada nestas linhagens celulares com a fração clorofórmio a 100 µg/mL pode estar relacionada a presença de flavonoides e terpenoides. Alguns flavonoides, como a quercetina, apresentam efeito citotóxico comprovado frente às linhagens de células leucêmicas humanas Jurkat, HL60, Molt, Raji e U937 (JOSIPOVIC; ORSOLIC, 2008). Os triterpenos, como o ácido betulínico, também apresentam efeito citotóxico para células tumorais de vários tecidos, sendo o mecanismo relacionado à esta atividade a diminuição da motilidade das células tumorais e apoptose devido à diminuição da expressão da bcl2 (RZESKI et al., 2006) e aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (FULDA, 2009).

A linhagem celular HL60-bcl2 teve origem a partir da transfecção da linhagem HL60 selvagem com a proteína antiapoptótica bcl2, promovendo a super-expressão desta proteína nas células transfectadas. Esta super-expressão confere proteção contra uma série de estímulos apoptogênicos, tornando a linhagem tumoral resistente a apoptose. A resistência a apoptose tem sido descrita como um dos fatores determinantes para a sobrevivência das células tumorais e reforçam a investigação científica em busca de novas drogas (PEREZ-TOMÁS et al., 2003; KAMB; LASSOTA, 2004; FLEISCHER et al., 2006).

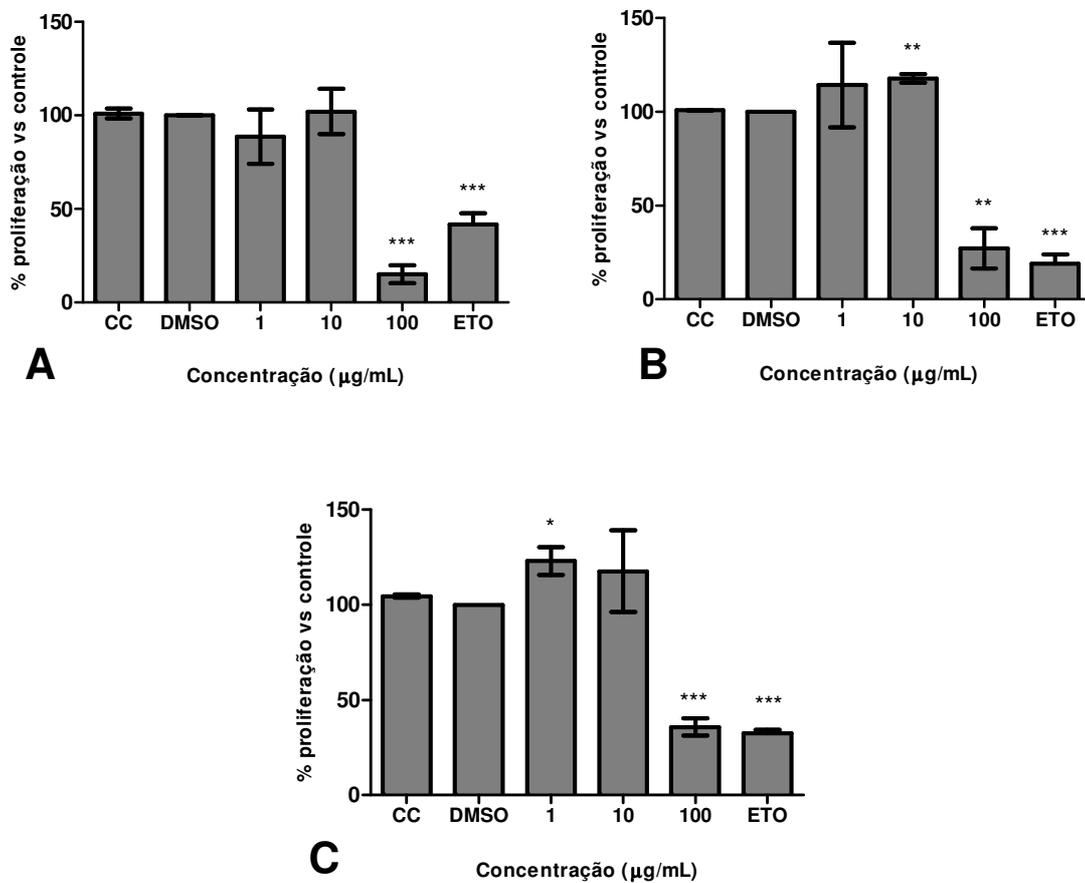


Figura 13. Atividade citotóxica *in vitro* da fração clorofórmio do extrato metanólico de *I. pes-caprae* (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam a média e o erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata; CC: controle celular; DMSO (dimetilsulfóxido ≤0,5%): controle negativo; ETO (etoposídeo a 10 µM): controle positivo; Comparação com DMSO: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

A atividade citotóxica da fração clorofórmio de *I. pes-caprae* na linhagem HL60-bcl2 (Figura 13C) foi similar ( $p > 0,05$ ) àquela encontrada na linhagem HL60 selvagem (Figura 13B), indicando que o(s) composto(s) presente(s) nesta fração modulam negativamente a super-expressão da proteína antiapoptótica bcl2 na linhagem transfectada. Esta redução da resistência das células HL60-bcl2 à morte celular sugere o envolvimento da apoptose.

A avaliação da fração acetato de etila obtida a partir do extrato metanólico de *I. pes-caprae* induziu crescimento dose-dependente das células esplênicas murinas,

tanto incubada isoladamente quanto junto à PHA e ao DMSO no cultivo celular ( $p < 0,001$ ) (Figura 14). A proliferação foi de 4,8% a 35,7% para fração isolada no cultivo celular (Figura 14A), de 2,5% a 39,3% quando a fração foi incubada junto ao mitógeno (Figura 14B) e de -14,9% a 31,2% quando a fração foi incubada com DMSO (Figura 14C).

A fração acetato de etila de *I. pes-caprae* a 10  $\mu\text{g/mL}$ , mantida no cultivo celular na ausência de PHA e DMSO, mostrou estímulo ao crescimento celular inferior ao controle positivo de proliferação celular (11,4%,  $p < 0,01$ ), enquanto que a 100  $\mu\text{g/mL}$  e 200  $\mu\text{g/mL}$  houve crescimento superior ao próprio mitógeno, respectivamente  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ . (Figura 14A). Este resultado foi semelhante ao observado quando a fração foi incubada junto ao mitógeno PHA ( $p < 0,01$ , Figura 14B). Quando a fração foi incubada junto ao DMSO, as concentrações de 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  e 200  $\mu\text{g/mL}$  mostraram crescimento celular com inibição total da atividade citotóxica do DMSO (-15,2%,  $p < 0,001$ ) (Figura 14C). Os resultados obtidos evidenciam o efeito imunoestimulador dose-dependente dos compostos presentes na fração acetato de etila de *I. pes-caprae* sobre a proliferação de células esplênicas murinas.

A proliferação das células esplênicas murinas tratadas com a fração acetato de etila de *I. pes-caprae*, nas concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$  e 200  $\mu\text{g/mL}$ , foi cerca de quatro vezes maior que aquela observada com o extrato metanólico nas mesmas concentrações, sugerindo que o(s) composto(s) responsáveis pela atividade imunoestimuladora estão presentes nesta fração. O estudo prévio desta mesma fração frente às células mononucleares humanas com e sem o estímulo da PHA também apresentou efeito imunoestimulador dose-dependente (DE CESARO et al., 2008b).

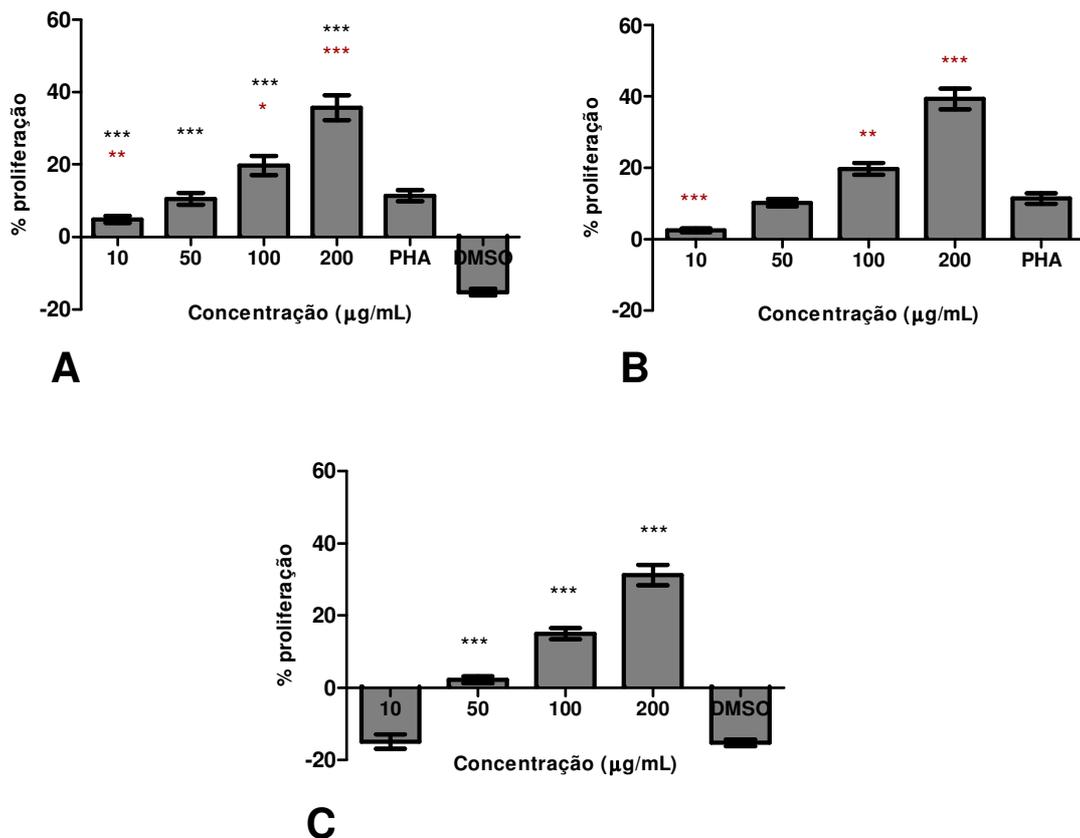


Figura 14. Proliferação de células esplênicas murinas *in vitro* frente à fração acetato de etila na *I. pes-caprae* (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, PHA, B) ou dimetilsulfóxido (10%, DMSO, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam média e erro padrão da média de quatro experimentos realizados em quadruplicata; PHA: fitohemaglutinina, controle positivo de proliferação celular; DMSO: dimetilsulfóxido, controle positivo de citotoxicidade; \*vermelho: comparação com PHA; \*preto: comparação com DMSO; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Dentre os compostos presentes na fração acetato de etila na *I. pes-caprae*, os terpenoides e alcaloides têm comprovada atividade imunoestimulatória, bem como os compostos com alto peso molecular como polissacarídeos e glicosídeos (WAGNER, 1990), as classes de ácidos fenólicos (WAGNER, 1990; FISCHER et al., 2007) e ainda as saponinas (FLECK et al., 2006; COSTA et al., 2005; RAJPUT et al., 2007).

Um estudo fitoquímico da fração acetato de etila (7,5 g) de *I. pes-caprae* isolou 15 compostos identificados espectroscopicamente, na seguinte ordem

decrecente de rendimento: isoquercitrina (171,4 mg), solasodina (124,4 mg), ácido salicílico (86,3 mg), glochidona (58 mg),  $\beta$ -sitosterol (49 mg), 2,4-dihidroxi-6-metoxiacetofenona (41,1 mg), quercetina (35,6 mg),  $\alpha$ -amirina (24,5 mg), ácido serícico (21,6 mg), acetato de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (19,5 mg), xantoxilina (16,6 mg), estigmasterol (12 mg),  $\beta$ -amirina (12 mg) e ácido betulínico (4 mg) (KROGH, 2001). Alguns destes compostos, obtidos de outras plantas, foram avaliados no modelo de proliferação celular e tiveram comprovada atividade imunoestimuladora. Como exemplo, o  $\beta$ -sitosterol aumentou em até cinco vezes a proliferação de células mononucleares humanas *in vitro*, com efeito superior ao mitógeno PHA (BOUIC et al., 1996). Somado a este composto, outras classes relatadas na literatura e descritas acima possuem atividade imunoestimuladoras e estão presentes na fração acetato de etila de *I. pes-caprae*, como as saponinas  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e acetato de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, os compostos fenólicos ácido salicílico e xantoxilina, o terpenoide 2,4-dihidroxi-6-metoxiacetofenona e ainda o estigmasterol.

A avaliação da atividade citotóxica da fração acetato de etila do extrato metanólico de *I. pes-caprae* nas concentrações de 1  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$  estão apresentados na Figura 15. Os valores de proliferação foram de 82,0% a 97,8% com células Jurkat (Figura 15A). Quanto testado frente a células HL60 (Figura 15B) e HL60-bcl2 (Figura 15C) os valores de proliferação celular foram superiores a 100%, indicando que esta fração pode ser capaz de estimular o crescimento das células tumorais. Todas as concentrações da fração acetato de etila não mostraram efeito citotóxico nas três linhagens celulares avaliadas em comparação ao controle negativo DMSO, com exceção da concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  frente às células Jurkat ( $p < 0,05$ ).

Além de *I. pes-caprae*, os compostos esteroidais estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol também foram isolados de outra espécie (*I. cairica*) e não demonstraram atividade citotóxica em células A549 e LNCaP (LI; CHEN; LO, 2008). O  $\beta$ -sitosterol também não demonstrou efeito tóxico quando testado em células do carcinoma gástrico (BGC-823) (CHEN et al., 2008). Ainda, dois novos ésteres do ácido quínico e dois conhecidos compostos cafetaninos isolados da fração acetato de etila de *I. pes-caprae* não apresentam citotoxicidade frente à células Jurkat (TERAMACHI et al., 2005).

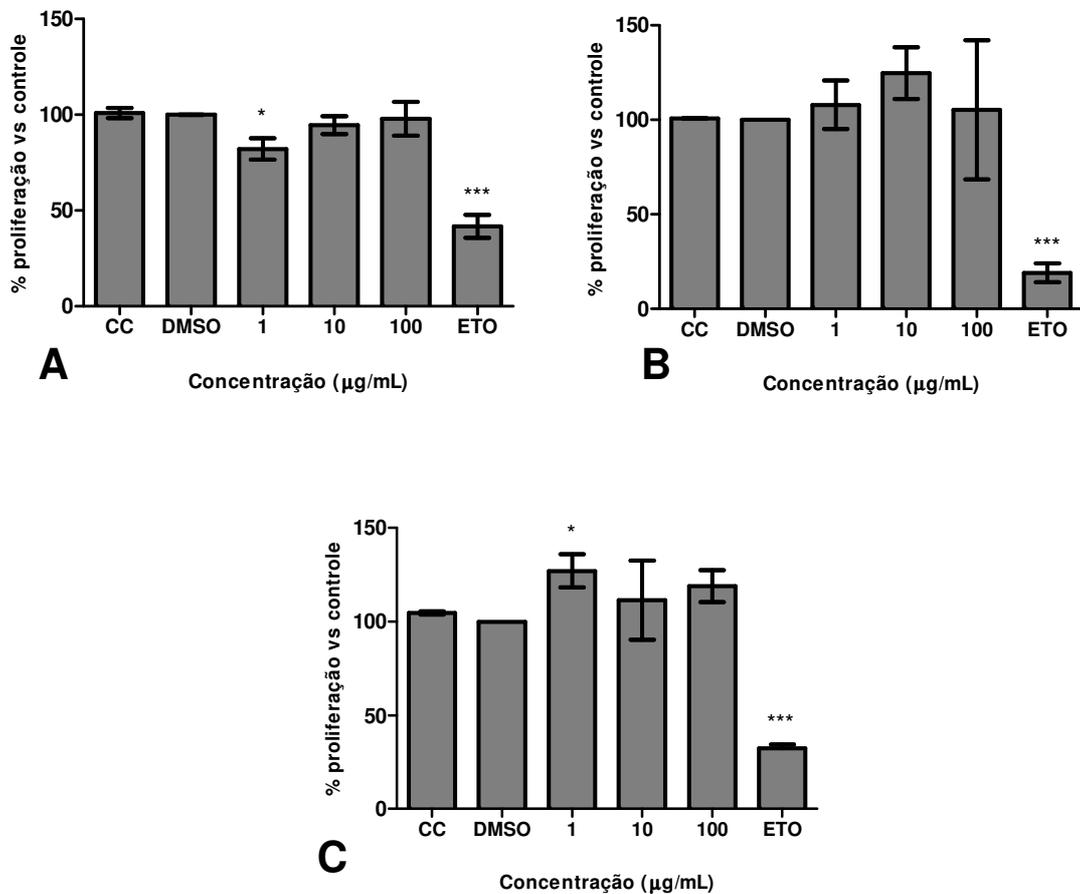


Figura 15. Atividade citotóxica *in vitro* da fração acetato de etila do extrato metanólico de *I. pes-caprae* (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>,

Resultados representam a média e o erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata; CC: controle celular; DMSO (dimetilsulfóxido ≤0,5%): controle negativo; ETO (etoposídeo a 10 µM): controle positivo; Comparação com DMSO: \* p<0,05; \*\*\* p<0,001.

Em contrapartida, outros compostos presentes nesta fração acetato de etila têm demonstrado atividade citotóxica. O ácido betulínico é capaz de inibir o crescimento de células tumorais da tireóide e mamas, neuroblastoma, carcinoma de cólon e pulmão, leucemia e mieloma múltiplo (RZESKI et al., 2006), enquanto que a quercetina demonstrou efeito citotóxico frente às linhagens de células leucêmicas humanas Jurkat, HL60, Molt, Raji e U937 (JOSIPOVIC; ORSOLIC, 2008). Estes dois compostos, embora presentes, não são os compostos majoritários na fração acetato

de etila de *I. pes-caprae* (KROGH, 2001), justificando a ausência de efeito citotóxico desta fração no presente estudo.

A toxicidade de drogas quimioterápicas para células normais é um efeito adverso importante no tratamento do câncer e tem norteado a busca por moléculas de baixa toxicidade para células normais e com toxicidade efetiva para células tumorais. O flavonoide quercetina, presente na fração acetato de etila de *I. pes-caprae*, tem sido relacionado ao elevado efeito apoptótico em linhagens de células leucêmicas quando comparado ao efeito promovido em células mononucleares humanas (LUGLI et al., 2009). Este mesmo flavonoide inibiu a proliferação de células Hep-2 (LIU; WANG, 2008) e BGC-823, provavelmente devido a um potente efeito apoptótico (CHEN et al., 2008). A isoquercitrina é outro flavonoide da fração acetato de etila de *I. pes-caprae*, sendo um dos constituintes majoritários da fração (KROGH, 2001). De acordo com Badria, Ameen e Akl (2007), este flavonoide mostrou atividade citotóxica em estudo com *Artemia salina* e tumor ascítico de Ehrlich.

Uma vez que a fração acetato de etila de *I. pes-caprae* estimulou o crescimento celular no modelo de proliferação *in vitro* de células esplênicas murinas e que em células leucêmicas humanas Jurkat, HL60 e HL60-bcl2 não houve efeito sobre a proliferação celular, exceto na concentração de 1 µg/mL frente às células Jurkat, é possível inferir as atividades imunoestimuladora e não citotóxica dos compostos esteroidais presentes na fração acetato de etila de *I. pes-caprae* parecem inibir a atividade citotóxica que outros compostos poderiam apresentar quando avaliados isoladamente. Isto indica que a continuidade do estudo biomonitorado com os constituintes desta fração pode revelar substâncias com atividade imunoestimuladora sobre o sistema imune.

A análise conjunta dos resultados obtidos com esta espécie permitiu verificar que o extrato metanólico e a fração acetato de etila de *I. pes-caprae* possuem compostos imunoestimuladores que favorecem o crescimento das células esplênicas murinas normais sem apresentar toxicidade às linhagens tumorais Jurkat, HL60 e HL60-bcl2. Esta espécie possui ainda compostos, predominantemente presentes na fração clorofórmio, que foram citotóxicos tanto para células normais quanto para as células tumorais Jurkat, HL60 e HL60-bcl2, sugerindo a apoptose como processo de morte celular devido a inibição da super-expressão da proteína antiapoptótica bcl2 nas células HL60-bcl2.

## 5.2 *Vernonia scorpioides*

Em estudo com o extrato metanólico de *V. scorpioides*, Zandonai (2007) demonstrou que o mesmo inibe o crescimento de células esplênicas murinas. Como continuidade do estudo biomonitorado com esta espécie, foram avaliadas o extrato metanólico e as frações hexano, diclorometano e acetato de etila, com vistas a determinar a fração cujos constituintes foram responsáveis pela atividade imunossupressora. Os resultados obtidos nos testes de linfoproliferação de células esplênicas murinas com o extrato metanólico de *V. scorpioides*, isoladamente ou simultaneamente à PHA ou DMSO, estão apresentados em percentagem de proliferação na Figura 16. As quatro concentrações do extrato não mostraram diferença significativa entre si em incubação isolada e simultânea à PHA ( $p > 0,05$ ) e ao DMSO ( $p = 0,05$ ).

O extrato metanólico de *V. scorpioides* induziu valores de proliferação de -5,1% a -10,6% frente às células esplênicas murinas (Figura 16A). As quatro concentrações do extrato testadas em cultivo celular demonstraram inibição do crescimento celular, com conseqüente diferença significativa do controle positivo de proliferação celular (10,9%,  $p < 0,001$ ). Embora os resultados obtidos tenham sido significativamente diferentes do controle positivo de citotoxicidade (-15,4%,  $p < 0,01$ ), os valores encontrados indicam que o extrato metanólico de *V. scorpioides* possui efeito imunossupressor sobre as células esplênicas murinas.

Este mesmo efeito imunossupressor foi observado quando o extrato foi incubado com o mitógeno PHA, com proliferação de -6,8% a -7,4% (Figura 16B) e que demonstram a supressão completa do estímulo mitogênico da PHA ( $p < 0,001$ ). O ensaio do extrato metanólico incubado junto ao DMSO no cultivo celular revelou valores de proliferação de -10,9% a -18,3% (Figura 16C), resultados estes semelhantes ao próprio controle positivo de citotoxicidade ( $p > 0,05$ ), com exceção da concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

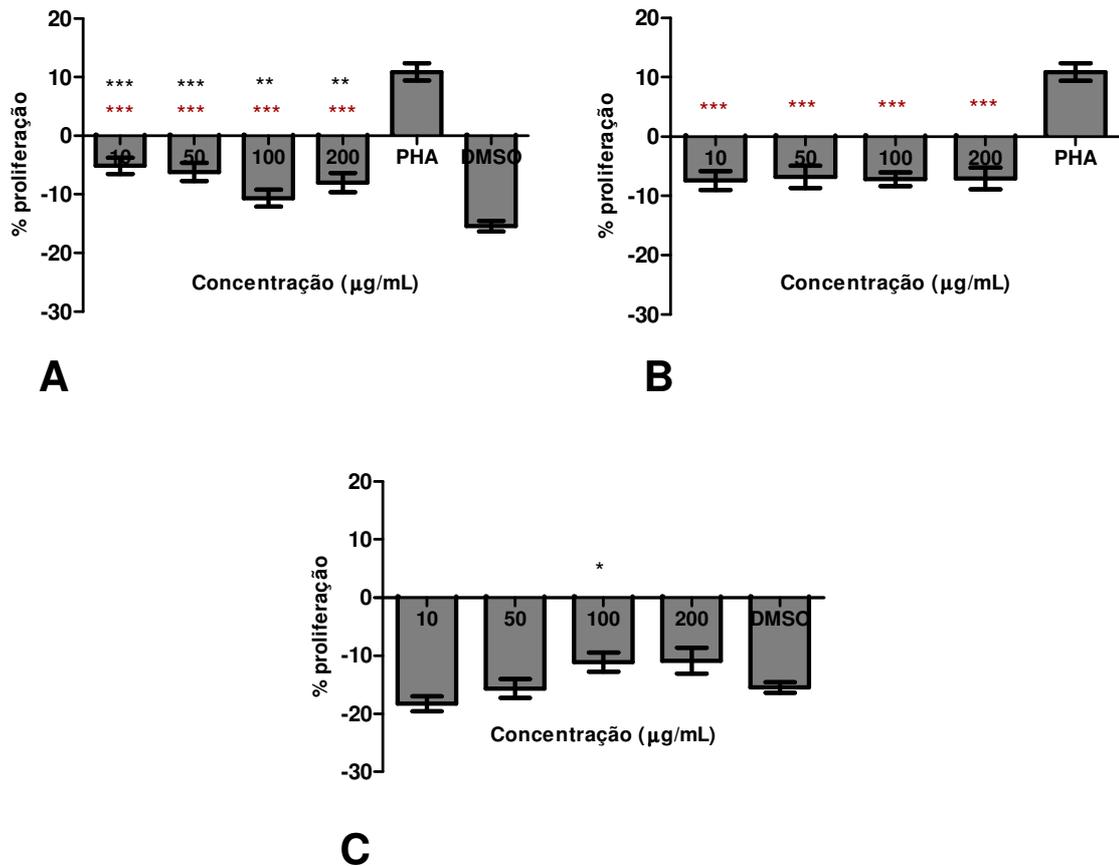


Figura 16. Proliferação de células esplênicas murinas *in vitro* frente ao extrato metanólico de *V. scorpioides* (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam média e erro padrão da média de quatro experimentos realizados em quadruplicata; PHA: fitohemaglutinina, controle positivo de proliferação celular; DMSO: dimetilsulfóxido, controle positivo de citotoxicidade; \*vermelho: comparação com PHA; \*preto: comparação com DMSO; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Em estudos realizados pelo grupo NIQFAR-UNIVALI com *V. scorpioides*, foi demonstrado que o extrato metanólico nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL inibiram a proliferação de células esplênicas murinas quando estimuladas com PHA (MENDES et al., 2007), enquanto nas concentrações de 10 a 200 µg/mL inibiram a proliferação de células mononucleares humanas (DE CESARO et al., 2008a).

O gênero *Vernonia* fitoquimicamente apresenta na sua composição alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonoides, terpenoides, incluindo as lactonas

sesquiterpênicas e ainda compostos como esteroides, taninos e polissacarídeos (BRUNETON, 1991; NERGARD et al., 2004; DIAZ, 2008). Dentre estes constituintes químicos, os comumente encontrados neste gênero são as lactonas sesquiterpênicas e os flavonoides (DIAZ, 2008).

Alguns destes componentes obtidos de outras fontes têm sido relacionados com atividade imunoestimuladora sobre a proliferação de linfócitos humanos *in vitro*, como saponinas (COSTA et al., 2005; FLECK et al., 2006; RAJPUT et al., 2007), terpenoides e alcaloides (WAGNER, 1990). Contrariamente, outros compostos presentes nesta espécie têm sido relacionados à atividade imunossupressora da proliferação de células esplênicas, como flavonoides (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008), triterpenoides (GAO et al., 2008). Ainda, algumas cumarinas obtidas de outras plantas têm mostrado não interferir na proliferação de leucócitos e hepatócitos humanos normais (ITO et al., 2003; KIMURA et al., 2005), bem como de linfócitos T estimulados com PHA (SHIMODA et al., 1998).

A associação provavelmente dos compostos presentes no extrato metanólico da planta manteve como prevalente o efeito imunossupressor em células esplênicas murinas aqui observado. Este mesmo efeito foi verificado frente às células mononucleares humanas (DE CESARO et al., 2008a), tornando, assim, a avaliação das frações deste extrato fundamental para a melhor definição da atividade da planta.

Outras espécies de *Vernonia* também vêm sendo pesquisadas quanto à atividade imunomoduladora no modelo de proliferação de células esplênicas. Como exemplo, dois polissacarídeos obtidos das raízes de *V. kotschyana* mostraram efeitos contrários na proliferação de células esplênicas murinas, a pectina sem interferir na proliferação de células esplênicas e a arabinogalactona induzindo a proliferação destas células (NERGARD et al., 2005).

Alguns autores têm descrito atividade citotóxica desta planta e de alguns dos seus constituintes (MENDES, 2001; PAGNO et al., 2006; BUSKÜL, 2007), que somados aos resultados sugestivos de atividade imunossupressora deste extrato metanólico aqui obtidos indicaram a necessidade de estudos com outras linhagens celulares para identificar o efeito citotóxico da planta. Assim, considerando a importância dos produtos naturais como fonte na obtenção de novos agentes quimioterápicos (BALUNAS; KINGHORN, 2005) e a descrição de atividade citotóxica da *V. scorpioides* (MENDES, 2001; PAGNO et al., 2006; BUSKÜL, 2007), o extrato

metanólico desta planta foi avaliado com vistas a identificar a presença de atividade citotóxica em três linhagens leucêmicas humanas, células Jurkat, HL60 e HL60-bcl2.

As células Jurkat frente às concentrações de 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL do extrato metanólico de *V. scorpioides* apresentaram proliferação de 28,7% a 119,0% (Figura 17A), as células HL60 de 21,8% a 118,5% (Figura 17B) e as HL60-bcl2 de 42,4% a 108,1% (Figura 17C). A concentração de 100 µg/mL mostrou ser significativamente inferior ao controle DMSO ( $p < 0,01$ ) nas três linhagens tumorais avaliadas, indicando efeito citotóxico do extrato nesta concentração.

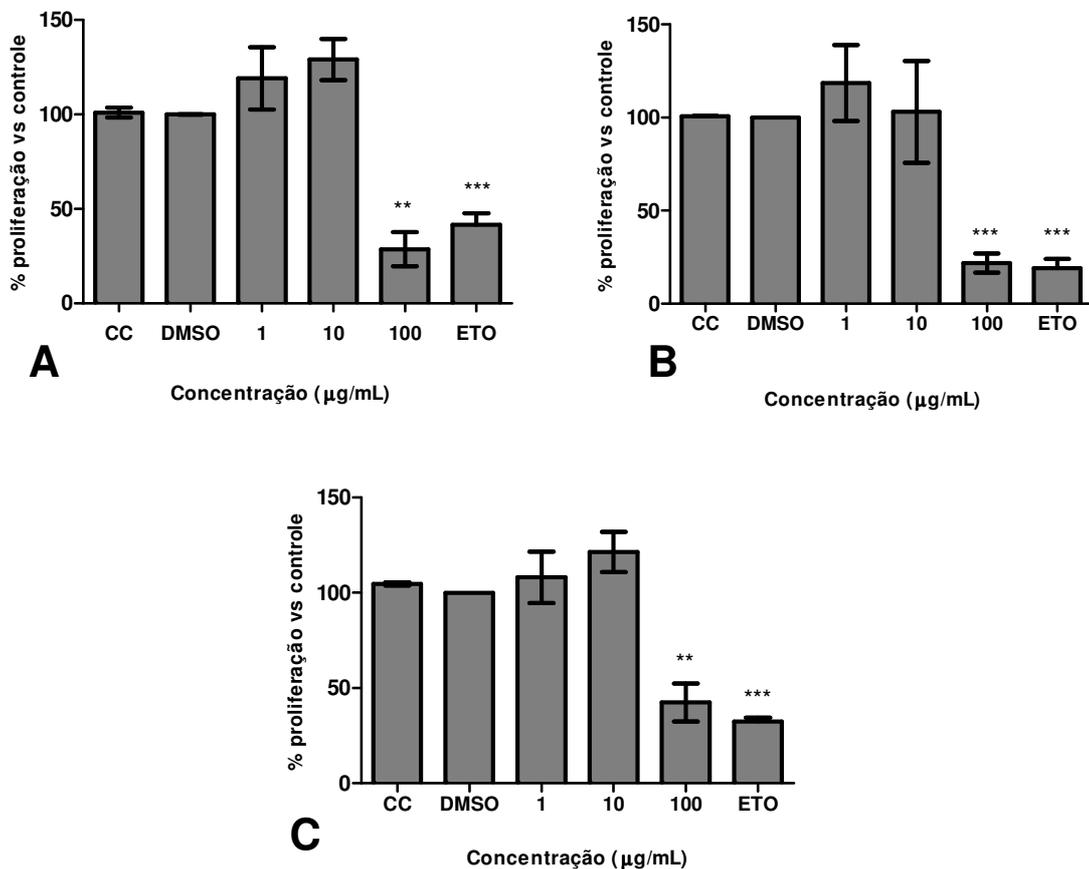


Figura 17. Atividade citotóxica *in vitro* do extrato metanólico de *V. scorpioides* (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam a média e o erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata; CC: controle celular; DMSO (dimetilsulfóxido ≤0,5%): controle negativo; ETO (etoposídeo a 10 µM): controle positivo; Comparação com DMSO: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

As lactonas, como hirsutinolídeos e glaucolídeo, isoladas a partir da fração diclorometano de *V. scorpioides* apresentaram atividade citotóxica *in vitro* sobre as linhagens celulares Hela, L929 e B16F10. O mecanismo de morte celular induzido por estas lactonas sesquiterpênicas foi identificado como necrose e apoptose (BUSKÜL, 2007).

Outras espécies de *Vernonia* estudadas quanto à atividade citotóxica têm comprovada a presença de compostos citotóxicos no gênero. O extrato etanólico de *V. pachyclada* apresentou citotoxicidade frente às células de câncer de ovário humano (A2780) e permitiu o isolamento da lactona sesquiterpênica glaucolídeo M com a mesma atividade citotóxica (WILLIAMS et al., 2005). A partir da *V. chinensis* foram obtidas três lactonas sesquiterpênicas com potente atividade citotóxica frente às células tumorais P388 e A549 (CHEN et al., 2005). Ainda, a atividade citotóxica em células de tumor linfóide de camundongo (P388) foi verificada em cinco sesquiterpenóides obtidos das partes aéreas de *V. bockiana* (HUO et al., 2008).

Além das lactonas presentes no gênero *Vernonia*, os flavonóides luteolina e apigenina também têm apresentado atividade citotóxica. Estes flavonóides mostraram atividade antiproliferativa frente às células tumorais humanas Hela e MCF-7 (células epiteliais de câncer da mama) e A431 (carcinoma epidérmico) (CSUPOR-LÖFFLER et al., 2008). Outros autores demonstraram que a luteolina e a apigenina tem efeito contra células leucêmicas humanas HL60 por apoptose devido à indução da ativação da cascata das caspases (LANDIS-PIWOWAR; MILACIC; DOU, 2008).

A atividade citotóxica também tem sido promovida por cumarinas, como a cumarina tricíclica GUT-70, que inibiu o crescimento de seis linhagens de células leucêmicas humanas (ITO et al., 2003; KIMURA et al., 2005). Ainda, o triterpeno lupeol presente na *V. scorpioides* (MENDES, 2001) e também em diversas plantas medicinais e frutas, mostrou eficiente atividade citotóxica contra células metastáticas de melanoma humano (451Lu) (SALEEM et al., 2008) e de câncer de próstata humano, neste último por apoptose (PRASAD; KALRA; SHUKLA, 2008; PRASAD et al., 2008). Outro terpenoide também presente na *V. scorpioides*, o limoneno (TOIGO et al., 2004), mostrou atividade antiproliferativa seletiva, inibindo a proliferação de células tumorais mas estimulando a proliferação de células esplênicas murinas (MANUELE et al., 2009; MANUELE; FERRARO; ANESINI, 2008).

A atividade citotóxica do extrato metanólico de *V. scorpioides* frente às células HL60-bcl2 foi semelhante ( $p>0,05$ ) àquela encontrada na linhagem HL60 selvagem (Figura 17B), sugerindo que a super-expressão da proteína antiapoptótica bcl2 (Figura 17C) foi modulada negativamente pelo(s) constituinte(s) químico(s) presente(s) no extrato, indicando citotoxicidade por apoptose.

Os resultados obtidos no modelo de proliferação de células esplênicas e de atividade citotóxica com células Jurkat, HL60 e HL60-bcl2, somados aos dados reportados na literatura e aqui discutidos, sugerem que o extrato metanólico de *V. scorpioides* possui atividade citotóxica não seletiva, atuando tanto que em células neoplásicas quanto em células normais.

A fração hexano obtida do extrato metanólico de *V. scorpioides* mostrou inibição da proliferação de células esplênicas murinas (Figura 18). Os valores de percentagens de proliferação foram de -14% a -13% para fração isolada (Figura 18A), de -6,7% a -10% para fração incubada com PHA (Figura 18B) e de -12,9% a -20,3% para fração incubada com DMSO (Figura 18C). As quatro concentrações da fração hexano não mostraram diferença significativa entre si quando incubada isoladamente ou simultaneamente à PHA ( $p>0,05$ ), porém quando incubado com DMSO houve diferença significativa ( $p< 0,05$ ), embora sem caracterizar efeito dose-resposta.

A inibição observada quando a fração hexano foi incubada isoladamente no cultivo celular foi significativamente inferior ao controle positivo de proliferação celular (10,9%,  $p<0,001$ ) e semelhante ao controle positivo de citotoxicidade (-15,4%,  $p>0,05$ ). Este achado também foi observado quando a fração foi incubada junto ao DMSO (Figura 18C). Ainda, o efeito inibitório promovido pelos componentes presentes nesta fração inibiu completamente a atividade mitogênica da PHA (Figura 18B).

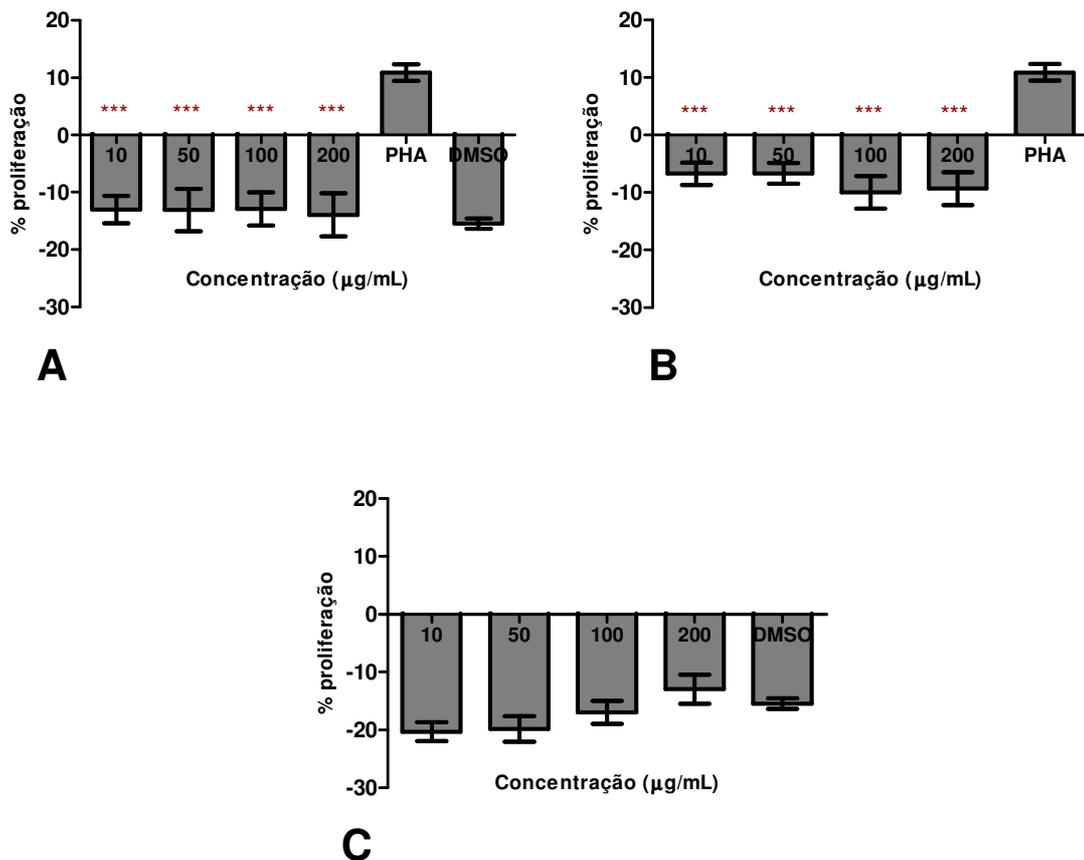


Figura 18. Proliferação de células esplênicas murinas *in vitro* frente à fração hexano do extrato metanólico de *V. scorpioides* (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam média e erro padrão da média de quatro experimentos realizados em quadruplicata; PHA: fitohemaglutinina, controle positivo de proliferação celular; DMSO: dimetilsulfóxido, controle positivo de citotoxicidade; \*vermelho: comparação com PHA; \*preto: comparação com DMSO; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

De forma similar ao observado com o extrato metanólico de *V. scorpioides*, a fração hexano da planta também mostrou inibição da proliferação de células esplênicas murinas, tendo sido cerca de duas vezes mais ativo que o extrato metanólico nas concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL. Isto sugere que os composto(s) responsável(is) pelo efeito imunossupressor ou citotóxico predominam nesta fração.

A fração hexano, assim como o extrato metanólico de *V. scorpioides*, também mostrou atividade inibitória sobre o crescimento de células mononucleares humanas (DE CESARO et al., 2008a). A polaridade do hexano empregado na partição do

extrato metanólico permite a purificação parcial de esteroides e terpenos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). A literatura tem apontado atividade inibitória da proliferação de células esplênicas para os terpenos (GAO et al., 2008), enquanto que os esteroides, principalmente os corticosteroides, possuem atividade imunossupressora multifatorial cujo emprego na terapia pós-transplante é muito bem definido (SCHULAK, 2004).

Seguindo os objetivos propostos no presente estudo, a fração hexano foi avaliada quanto à atividade citotóxica. As células Jurkat nos testes de citotoxicidade frente à fração hexano de *V. scorpioides* nas concentrações de 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL, mostraram proliferação com valores de 103,0% a 113,2% para células Jurkat (Figura 19A), de 71,9% a 111,2% para células HL60 (Figura 19B) e de 74,0% a 114,8% para células HL60-bcl2 (Figura 19C). Nas células Jurkat os valores de proliferação obtidos nas três concentrações foram similares ao controle DMSO ( $p > 0,40$ ), demonstrando não haver efeito citotóxico. Em contrapartida, nas células HL60 e HL60-bcl2 a concentração de 100 µg/mL da fração mostrou efeito citotóxico frente ao controle DMSO ( $p < 0,01$ ).

Contrariamente ao observado com o extrato metanólico de *V. scorpioides*, a fração hexano mostrou atividade citotóxica seletiva apenas para as células HL60 e HL60-bcl2, pertencentes à linhagem mielóide, sem apresentar efeito sobre a linhagem linfocítica Jurkat (Figura 19). A citotoxicidade encontrada na linhagem mielóide foi cerca de 3 vezes menor nas células HL60 e cerca de 2 vezes menor nas células HL60-bcl2, ambas em comparação ao extrato metanólico da planta. Um dos compostos presentes nesta fração, o estigmasterol, quando isolado de outras espécies, não mostrou atividade citotóxica em células tumorais não leucêmicas, A549 e LNCaP (LI; CHEN; LO, 2008).

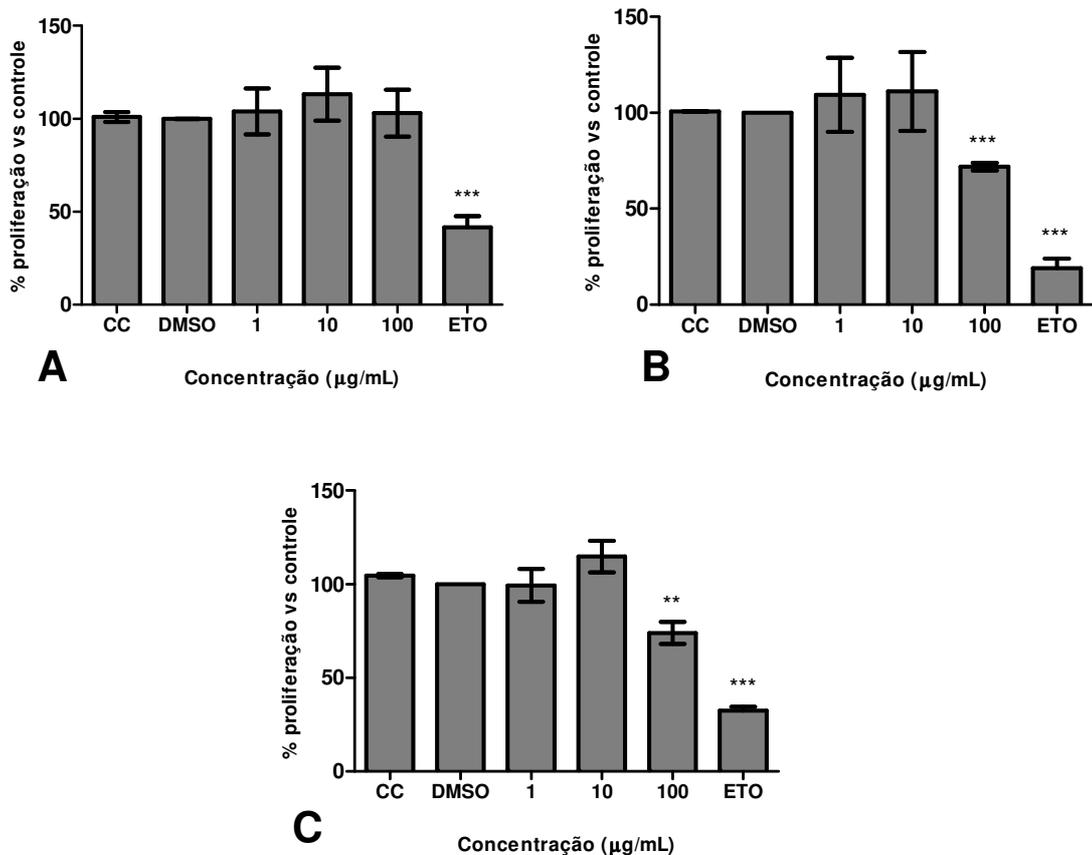


Figura 19. Atividade citotóxica *in vitro* da fração hexano do extrato metanólico de *V. scorpioides* (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam a média e o erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata; CC: controle celular; DMSO (dimetilsulfóxido ≤0,5%): controle negativo; ETO (etoposídeo a 10 µM): controle positivo; Comparação com DMSO: \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001

Em contrapartida, o terpeno lupeol presente na *V. scorpioides* (MENDES, 2001) e também em diversas plantas medicinais e frutas, mostrou eficiente atividade citotóxica contra células metastáticas de melanoma humano (451Lu) (SALLEM et al., 2008) e de câncer de próstata humano, envolvendo neste último a morte por apoptose pela via intrínseca (PRASAD; KALRA; SHUKLA, 2008; PRASAD et al., 2008). O terpenoide limoneno mostrou atividade antiproliferativa seletiva, inibindo a proliferação de células tumorais, mas estimulando a proliferação de células esplênicas murinas (MANUELE et al., 2009; MANUELE; FERRARO; ANESINI,

2008). Este terpenoide também está presente na *V. scorpioides* (TOIGO et al., 2004).

A análise estatística dos resultados obtidos com as duas células da linhagem mielóide estudadas frente à fração hexano de *V. scorpioides* demonstrou que o efeito citotóxico foi semelhante ( $p=0,7735$ ), sugerindo que a super-expressão da proteína antiapoptótica foi inibida pelos constituintes da fração e indicando o processo de morte por apoptose. Este achado corrobora com os relatos na literatura acerca da atividade citotóxica dos terpenoides, que tem sido atribuída à indução de apoptose (LANDIS-PIWOWAR; MILACIC; DOU, 2008; MANUELE et al., 2009; PRASAD; KALRA; SHUKLA, 2008; PRASAD et al., 2008).

Embora a fração hexano da *V. scorpioides* seja atuante tanto em células normais quanto em células leucêmicas e cujo mecanismo de morte celular parece envolver apoptose, esta fração mostrou possuir constituintes que diferem na atividade citotóxica dependendo da origem da linhagem tumoral avaliada. Desta forma, a identificação dos compostos presentes nesta fração responsáveis pelo efeito antiproliferativo na linhagem mielocítica mostra-se como um estudo promissor.

A fração diclorometano obtida a partir do extrato metanólico de *V. scorpioides* mostrou inibição do crescimento celular nas quatro concentrações testadas e nas três condições de cultivo – isolada, junto à PHA e junto ao DMSO (Figura 20). A inibição do crescimento celular não mostrou característica de relação dose-resposta nas três condições de cultivo, embora as quatro concentrações tenham mostrado diferença significativa quando incubadas isolada ou com o DMSO ( $p<0,05$ ).

Os valores de proliferação das células esplênicas frente a fração diclorometano foram de -3,5% a -11,6% (Figura 20A), de -8,4% a -13,1% quando adicionado PHA (Figura 19B) e de -12,7% a -20,6% quando adicionado DMSO (Figura 20C). Estas percentagens de crescimento foram significativamente inferiores ao controle positivo de proliferação celular (10,9%,  $p<0,001$ ). Ainda, o efeito inibitório sobre a proliferação celular promovido pela fração diclorometano incubada junto ao DMSO foi semelhante àquela encontrada no controle positivo de citotoxicidade (-15,4%,  $p>0,05$ , Figura 20C). Estes resultados sugerem os compostos responsáveis pela atividade imunossupressora da *V. scorpioides* também estão presentes na fração diclorometano.

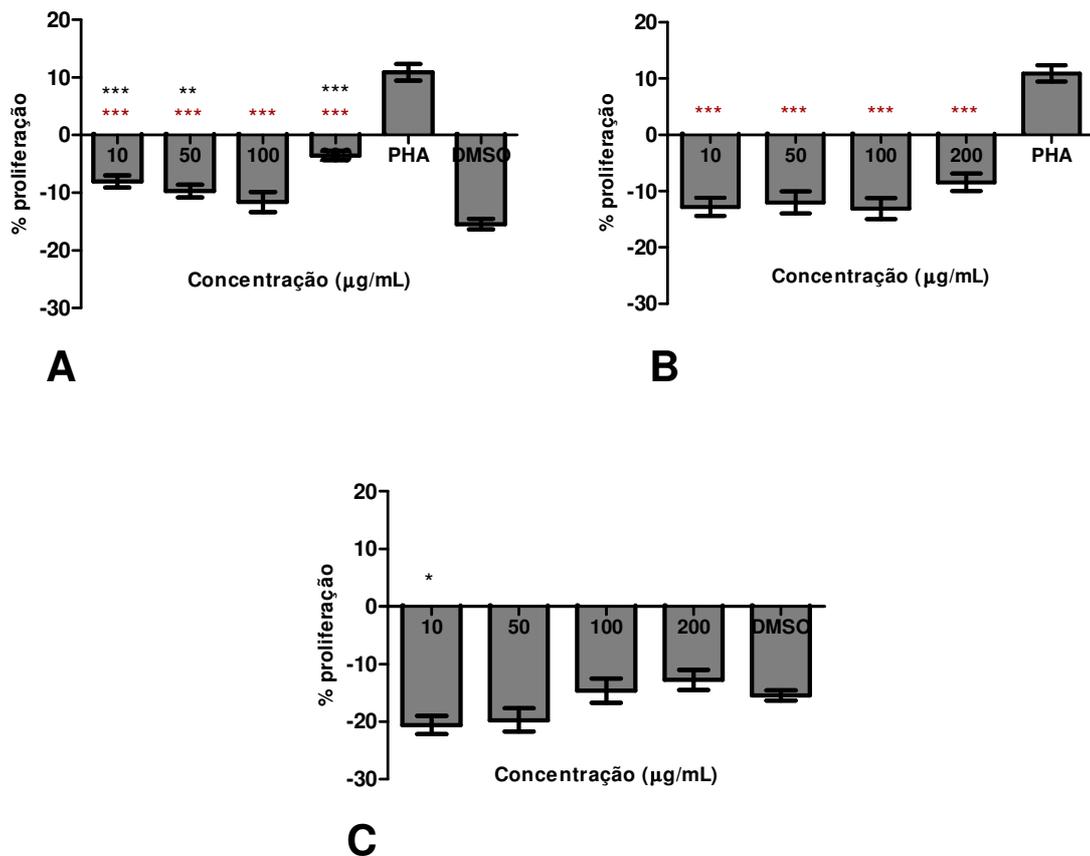


Figura 20. Proliferação de células esplênicas murinas *in vitro* frente à fração diclorometano do extrato metanólico de *V. scorpioides* (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam média e erro padrão da média de quatro experimentos realizados em quadruplicata; PHA: fitohemaglutinina, controle positivo de proliferação celular; DMSO: dimetilsulfóxido, controle positivo de citotoxicidade; \*vermelho: comparação com PHA; \*preto: comparação com DMSO; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Os compostos presentes na fração diclorometano mostraram atividade inibitória sobre a proliferação de células esplênicas murinas semelhante aquela encontrada no extrato metanólico e na fração hexano de *V. scorpioides*. A única exceção foi para a concentração de 200 µg/mL, na qual o extrato metanólico e a fração hexano foram mais ativos que a fração diclorometano, respectivamente, cerca de 2 e 4 vezes.

A fração diclorometano de *V. scorpioides* também mostrou atividade inibitória sobre o crescimento de células mononucleares humanas, sendo três vezes mais

ativa que a fração aquosa e duas vezes mais que a fração acetato de etila e hexano e que o próprio extrato metanólico da planta (DE CESARO et al., 2008a). A extração dos compostos presentes no extrato metanólico de *V. scorpioides* com o solvente diclorometano permite a purificação parcial de flavonoides, triterpenoides, lactonas e cumarinas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

A luteolina e a apigenina, dois flavonoides já isolados de *V. scorpioides* (BUSKÜL, 2007), quando obtidos comercialmente inibiram a proliferação de células esplênicas murinas (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008). Contrariamente, o terpenoide limoneno, também presente na *V. scorpioides* (TOIGO et al., 2004), mostrou atividade antiproliferativa seletiva, inibindo a proliferação de células tumorais mas estimulando a proliferação de células esplênicas murinas (MANUELE; FERRARO; ANESINI, 2008). Contrariamente, as cumarinas parecem não interferir na proliferação de células normais, uma vez que a cumarina tricíclica não inibiu a proliferação dos leucócitos e hepatócitos humanos normais (ITO et al., 2003; KIMURA et al., 2005) e a isocumarina tumberginol não suprimiu a proliferação de linfócitos T estimulados com PHA (SHIMODA et al., 1998).

A fração diclorometano nas concentrações de 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL avaliada nos ensaios de atividade citotóxica mostrou proliferação de 19,4% a 106,3% nas células Jurkat (Figura 21A), de 9,2% a 76,0% nas células HL60 (Figura 21B) e de 15,4% a 123,9% nas células HL60/bcl2 (Figura 21C), tendo nestas duas últimas efeito dose-dependente. As concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL da fração mostraram efeito citotóxico frente ao controle DMSO ( $p < 0,01$ ) em células Jurkat e HL60, tendo a 100 µg/mL em células Jurkat maior atividade que o próprio etoposídeo ( $p < 0,05$ ). A concentração de 100 µg/mL frente às células HL60-bcl2 também mostrou ser mais efetivo que o etoposídeo ( $p < 0,05$ ).

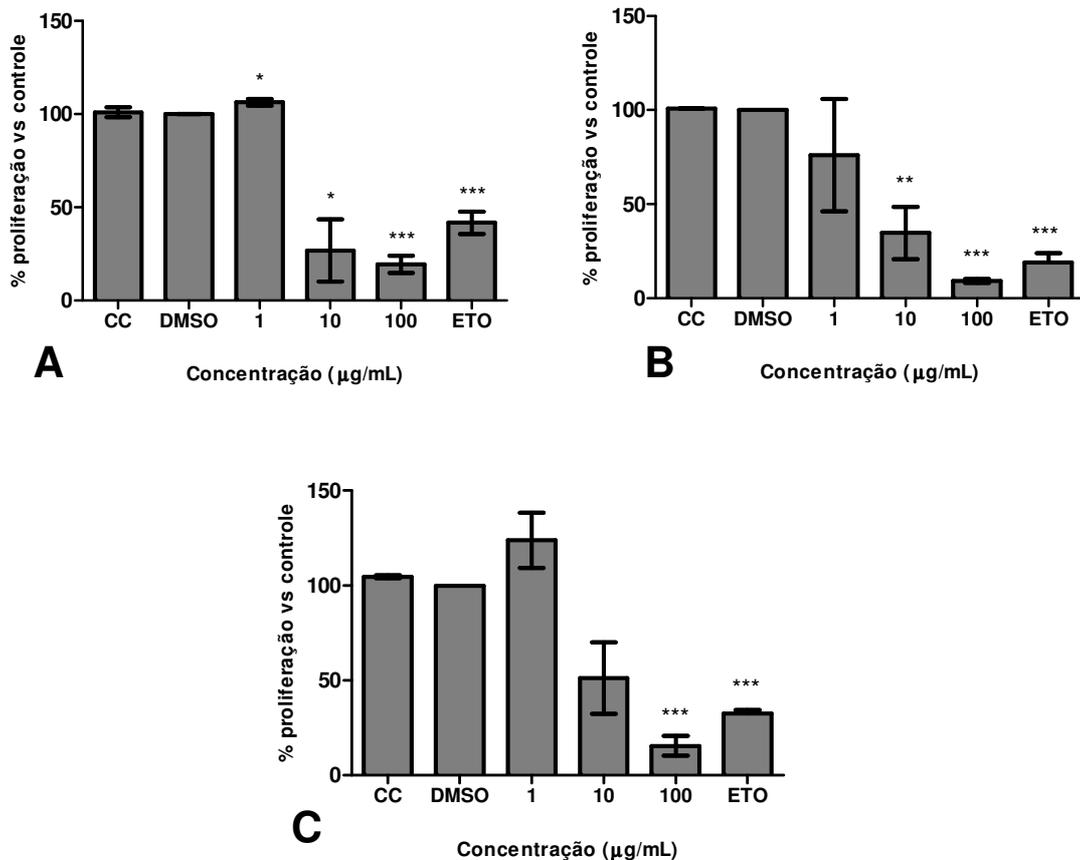


Figura 21. Atividade citotóxica *in vitro* da fração diclorometano do extrato metanólico de *V. scorpioides* (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam a média e o erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata; CC: controle celular; DMSO (dimetilsulfóxido ≤0,5%): controle negativo; ETO (etoposídeo a 10 µM): controle positivo; Comparação com DMSO: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

A atividade citotóxica encontrada com a fração diclorometano de *V. scorpioides* nas linhagens leucêmicas humanas Jurkat, HL60 e HL60-bcl2 é desencadeada pelos compostos que estão prioritariamente nesta fração. Esta hipótese é fundamentada pela maior citotoxicidade desta fração nas três linhagens em relação ao extrato metanólico (cerca de 2 vezes) e a fração hexano (mais de 5 vezes). A fração diclorometano inclui compostos que, isolados desta espécie e de outras, possuem atividade citotóxica descrita na literatura, como as lactonas sesquiterpênicas (CHEN et al., 2005; WILLIAMS et al., 2005; BUSKÜL, 2007; HUO et al., 2008), os terpenoides (MANUELE et al., 2009; MANUELE; FERRARO;

ANESINI, 2008), os flavonoides (CSUPOR-LÖFFLER et al., 2008; LANDIS-PIWOWAR; MILACIC; DOU, 2008) e ainda as cumarinas (ITO et al., 2003; KIMURA et al., 2005).

O processo de morte envolvido na atividade citotóxica destes compostos incluem indução de apoptose e necrose (BUSKÜL, 2007) ou então somente à apoptose (MANUELE et al., 2009; LANDIS-PIWOWAR; MILACIC; DOU, 2008). O emprego das células HL60-bcl2 no presente estudo verificou que a fração diclorometano manteve a atividade citotóxica mesmo frente a super-expressão da proteína antiapoptótica bcl2 (Figura 21C). A atividade observada nesta linhagem foi semelhante ( $p > 0,05$ ) aquela encontrada com a linhagem HL60 selvagem (Figura 21B), indicando que a fração diclorometano modula negativamente a super-expressão da proteína bcl2 nas células transfectadas.

Da mesma forma que observado com o extrato metanólico da *V. scorpioides*, a avaliação conjunta dos resultados obtidos com a fração diclorometano desta espécie permite inferir que a mesma possui atividade citotóxica tanto células normais quanto em células leucêmicas. Desta forma, o isolamento e a identificação das lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e terpenoides responsáveis pelo efeito antiproliferativo desta fração permitirá também a elucidação do mecanismo de ação envolvido na atividade.

As células esplênicas murinas tratadas com a fração acetato de etila, obtida a partir do extrato metanólico de *V. scorpioides*, apresentou proliferação de 5,3% a 23,3% (Figura 22A), de 3,1% a 22% quando incluído PHA (Figura 22B) e de -16,6% a 19,5% quando incluído DMSO (Figura 22C). Nestas três condições de cultivo foi observada diferença significativa entre as quatro concentrações da fração ensaiadas ( $p < 0,001$ ), embora o efeito dose-resposta não tenha sido observado.

O estímulo sobre a proliferação celular encontrado para a fração acetato de etila 200 µg/mL foi superior ao próprio controle positivo de proliferação celular (10,9%,  $p < 0,001$ ), inclusive potencializando o efeito do mitógeno (Figura 22B). Ainda, as concentrações superiores a 50 µg/mL mostram que os compostos presentes nesta fração inibem completamente o efeito citotóxico do DMSO (-15,4%,  $p < 0,001$ ), estimulando a proliferação das células (Figura 22C). Estes achados indicam que os compostos responsáveis pela atividade antiproliferativa da planta não estão presentes na fração acetato de etila.

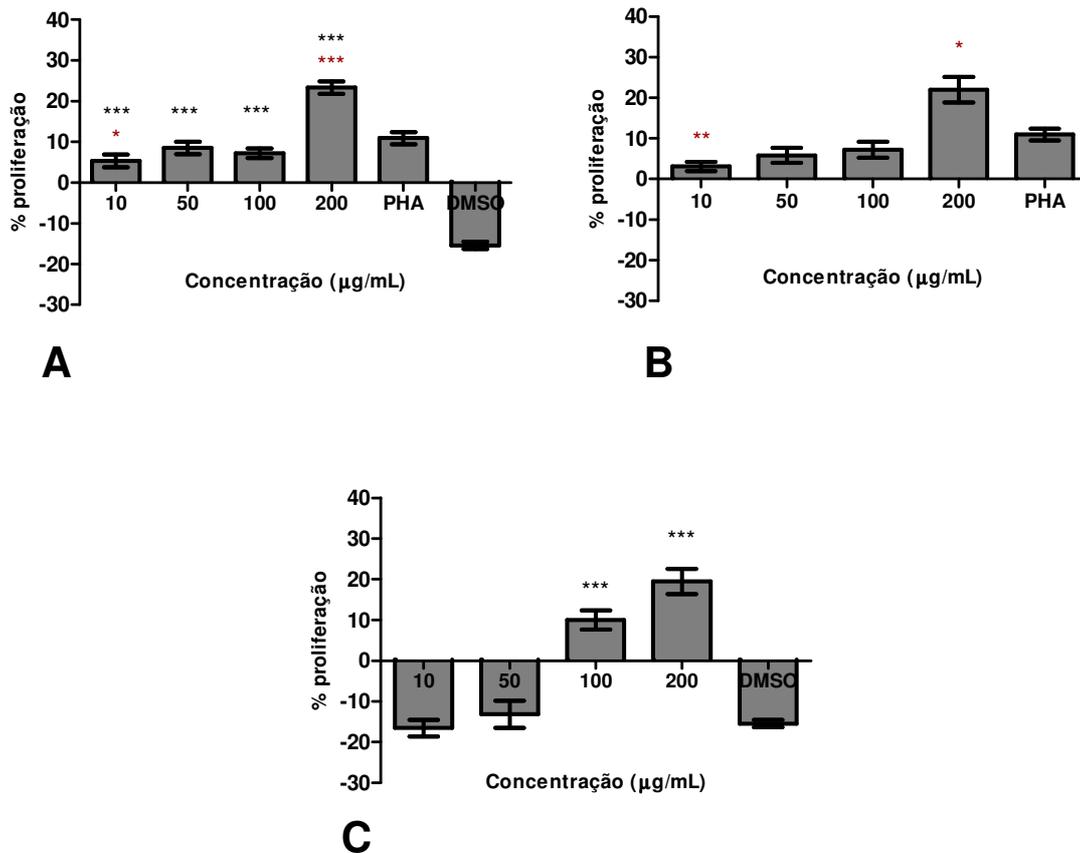


Figura 22. Proliferação de células esplênicas murinas *in vitro* frente à fração acetato de etila do extrato metanólico de *V. scorpioides* (10, 50, 100 e 200 µg/mL) incubadas isolada (A) ou simultaneamente à fitohemaglutinina (5 µg/mL, B) ou dimetilsulfóxido (10%, C) durante 72 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam média e erro padrão da média de quatro experimentos realizados em quadruplicata; PHA: fitohemaglutinina, controle positivo de proliferação celular; DMSO: dimetilsulfóxido, controle positivo de citotoxicidade; \*vermelho: comparação com PHA; \*preto: comparação com DMSO; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Considerando a característica na extração com o solvente acetato de etila e os compostos presentes no extrato metanólico de *V. scorpioides* descritos na literatura, é sugerido que esta fração contenha saponinas e flavonoides (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Alguns destes constituintes possuem relatos na literatura acerca da atividade inibitória sobre a proliferação de células esplênicas, como os flavonoides luteolina e apigenina (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008), ambos presentes nesta espécie (BUSKÜL, 2007). Entretanto, outros constituintes têm sido

relacionados com atividade imunoestimuladora sobre a proliferação de linfócitos humanos *in vitro*, como as saponinas (COSTA et al., 2005; FLECK et al., 2006; RAJPUT et al., 2007) .

A imunoestimulação na proliferação das células esplênicas murinas promovida pela fração acetato de etila de *V. scorpioides* ocorreu predominantemente em elevadas concentrações. Efeito contrário desta mesma fração foi observado em células mononucleares humanas, independentemente da concentração empregada (DE CESARO et al., 2008a). A discrepância entre os resultados obtidos com células esplênicas murinas e células mononucleares humanas reflete o funcionamento preciso do sistema imune murino e humano (RINK et al., 1994; PUREN; FANTUZZI DINARELLO, 1999), principalmente devido ao diferente número de linhagens celulares presentes no material biológico (PAUL, 2003). A utilização de células esplênicas envolve estudo de cerca de linfócito T (41%) e linfócitos B (47%), enquanto que o emprego de células mononucleares do sangue periférico implica no estudo aproximadamente 69% de linfócitos T e 10% de linfócitos B (MARTINS-FILHO; MELLO; CORREA-OLIVEIRA, 1998). A avaliação da proliferação destes dois modelos frente ao mitógeno lipopolissacáride (LPS) poderá evidenciar se a fração acetato de etila promove maior estímulo na proliferação de linfócitos B, se o efeito observado está relacionado à morte de linfócitos T, ou então ambos.

Nos ensaios de atividade citotóxica, as células Jurkat apresentaram proliferação de 30,4% a 97,5% frente a fração acetato de etila do extrato metanólico de *V. scorpioides* nas concentrações de 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL (Figura 23A). A concentração de 100 µg/mL desta fração apresentou efeito significativamente inferior ao controle DMSO ( $p < 0,01$ ). As células HL60 mostraram proliferação de 25,1% a 99,4% (Figura 23B) e as células HL60-bcl2 de 37,0% a 102,3% (Figura 23C). A concentração de 100 µg/mL mostrou atividade citotóxica nas três linhagens estudadas em comparação ao DMSO ( $p < 0,01$ ) e de forma semelhante aquela encontrada no extrato metanólico.

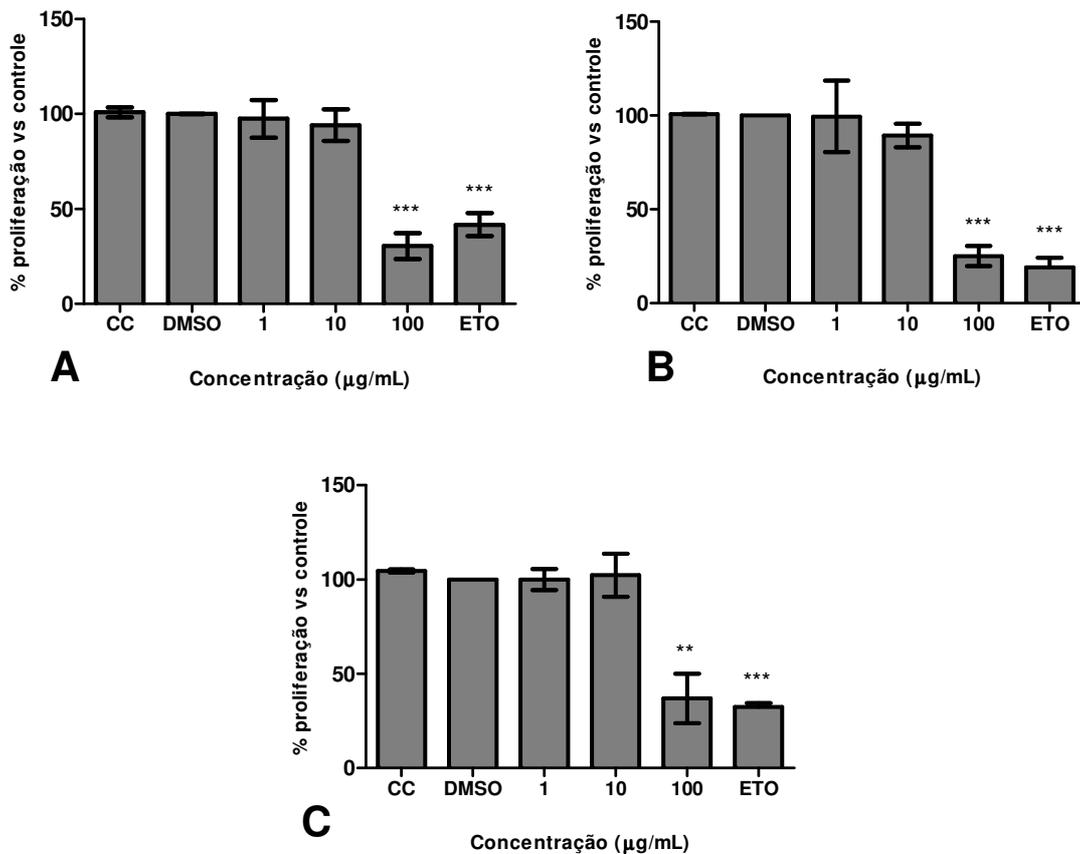


Figura 23. Atividade citotóxica *in vitro* da fração acetato de etila do extrato metanólico de *V. scopioides* (1, 10 e 100 µg/mL) em células leucêmicas humanas Jurkat (A), HL60 (B) e HL60-bcl2 (C) durante 48 horas a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Resultados representam a média e o erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata; CC: controle celular; DMSO (dimetilsulfóxido ≤0,5%): controle negativo; ETO (etoposídeo a 10 µM): controle positivo; Comparação com DMSO: \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Alguns flavonoides presentes no gênero *Vernonia*, como luteolina e apigenina, têm apresentado atividade citotóxica. Estes compostos apresentaram atividade citotóxica frente às células tumorais humanas Hela, MCF-7 e A431 (CSUPOR-LÖFFLER et al., 2008). Nas células leucêmicas humanas HL60 estes dois flavonoides induziram a ativação da cascata das caspases, iniciando o processo de morte por apoptose (LANDIS-PIWOWAR; MILACIC; DOU, 2008).

A comparação dos resultados obtidos com as células HL60 e HL60-bcl2 aqui apresentada (p>0,05) sugerem que o(s) composto(s) da fração acetato de etila

atenuam a super-expressão da proteína bcl2, provalmente induzindo o processo de morte celular por apoptose. Os relatos na literatura acerca da atividade citotóxica dos flavonoides, também presentes nesta fração, têm sido atribuídos à indução de apoptose (LANDIS-PIWOWAR; MILACIC; DOU, 2008).

Os resultados obtidos com a fração acetato de etila permitem inferir que a associação dos compostos na fração confere uma característica diferenciada quanto à atividade biológica aqui estudada, ou seja, uma atividade antiproliferativa seletiva. Isto porque esta fração mostrou atividade citotóxica frente às células tumorais Jurkat, HL60 e HL60-bcl2, mas não frente às células esplênicas murinas normais, inclusive apresentando atividade imunoestimuladora sobre esta última população celular. Considerando que as células de defesa sofrem a ação da maioria dos agentes quimioterápicos devido ao rápido crescimento celular (ALMEIDA et al., 2005), somada a atividade citotóxica seletiva aqui encontrada é sugestivo que o estudo desta fração apresenta-se como promissor na identificação de novos agentes neoplásicos.

A análise conjunta dos resultados obtidos no estudo com *V. scorpioides* mostraram que o extrato metanólico e as frações hexano e diclorometano desta espécie possuem compostos citotóxicos frente as células esplênicas murinas normais e as linhagens tumorais Jurkat, HL60 e HL60-bcl2, exceto para a fração hexano frente às células Jurkat. Outro achado relevante foi observado com a fração acetato de etila, cuja atividade antiproliferativa seletiva mostra-se promissora ao destruir células neoplásicas mantendo a integridade de células normais, inclusive estimulando as células de defesa. A atividade citotóxica encontrada nesta espécie parece estar relacionada a indução de apoptose como via de morte celular.

## 6 CONCLUSÕES

O extrato metanólico e a fração acetato de etila de *I. pes-caprae* estimularam o crescimento de células esplênicas murinas *in vitro*. Contrariamente, a fração clorofórmio foi citotóxica tanto para células esplênicas murinas quanto para células leucêmicas humanas, modulando negativamente a super-expressão da proteína antiapoptótica bcl2 e sugerindo apoptose como o processo de morte envolvido.

O extrato metanólico e a fração diclorometano de *V. scorpioides* possuem compostos citotóxicos para células esplênicas murinas normais e para células leucêmicas humanas Jurkat, HL60 e HL60-bcl2. A fração hexano somente não foi citotóxica para a linhagem de leucemia linfoide humana. A fração acetato de etila mostrou seletividade na atividade apresentada, com efeito citotóxico apenas para as três linhagens tumorais e não para as células normais, apresentando inclusive efeito imunoestimulador sobre as células esplênicas murinas. O(s) composto(s) presente(s) no extrato metanólico e nas três frações avaliadas desta espécie parecem modular negativamente a super-expressão da proteína antiapoptótica bcl2, sugerindo apoptose como processo de morte celular envolvido na citotoxicidade encontrada.

A partir deste estudo é possível sugerir que os compostos mais apolares em relação aqueles extraídos com acetato de etila, presentes na *I. pes-caprae* e *V. scorpioides*, são responsáveis pela atividade citotóxica nas células normais e tumorais avaliadas. Por outro lado, é sugestivo que os compostos mais polares em relação aos solventes empregados (hexano, diclorometano e clorofórmio) sejam os responsáveis pela atividade imunoestimuladora em células esplênicas murinas nestas duas plantas, apresentando ainda diferenças fitoquímicas que conferem citotoxicidade em células tumorais apenas para *V. scorpioides*.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ALMEIDA, S.; PALHANO, G.C. ***Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers: A avaliação da atividade e efeito cicatrizante em feridas na pele de cobaias**. Monografia (Graduação em Farmácia). Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2001.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; ANTONIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 843-848, 2003.
- BADRIA, F.A.; AMEEN, M.; AKL, M.R. Evaluation of cytotoxic compounds from *Calligonum comosum* L. growing in Egypt. **Journal of Biosciences**, v. 62, n.9, p.656-660, 2007.
- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BERTO, J.C.; RAPOPORT, A.; LEHN, C.N.; CESTARI FILHO, G.A.; JAVARONI, A.C. Relação entre o estadiamento, o tratamento e a sobrevida no câncer. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n.4, p. 207-210, 2006.
- BETANCUR-GALVIS, L.A.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J.E. Antitumor and antiviral activity of colombian medicinal plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.4, p. 531 – 535, 1999.
- BEZERRA, D.P.; MILITÃO, G.C.G.; CASTRO, F.O.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n.1, p. 1-8, 2007.
- BITTRICH, V.; AMARAL, M.C.E. **Plantas aquáticas e palustres do Estado de São Paulo**. Jan. 2004. Disponível em: <[http://www.ib.unicamp.br/plant-aq-SP/img/plantas/Vernonia\\_scorpioides.html](http://www.ib.unicamp.br/plant-aq-SP/img/plantas/Vernonia_scorpioides.html)>. Acesso em: 28 ago. 2007.
- BORENFREUND, E. Neutral Red Cytotoxicity Assay. **ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol**, n° 64, p. 1-16, 1992.

BOUIC, P.J.D.; ETSEBETH, S.; LIEBENBERG, R.W.; ALBRECHT, C.F.; PEGEL, K.; VAN JAARSVELD, P.P.  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 18, n.12, p.693-700, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência a Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. **Estimativas da incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

BREHMER, J.S. **Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de ehrlich**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

BRUNETON, J. G. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991.

BUENO, E.C., VAZ, A.J., OLIVEIRA, C.A., MACHADO, L.R., LIVRAMENTO, J.A., MIELLI, S.R., UEDA, M. Analysis of cells in cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis by means of flow cytometry. **Cytometry**, v. 38, p. 106-110, 1999.

BUSKÜHL, H. **Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxico de lactonas sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de Vernonia scorpioides (Lam)Pers**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

CABRERA, A.L.; KLEIN, R.M. Compostas: Tribo Vernonieae. **Flora Ilustrada catarinense**. Itajaí, n.3, 1980.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401-418, 2000.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

CAMPOS, M.P. **Avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana de extratos e frações da planta Vernonia scorpioides (Lam). Pers. (Asteraceae)**. Monografia (Graduação em Farmácia). Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2001.

CARDOZO, A.M.; EMENDORFER, F.; EMENDORFER, F.; BELLATO, F.; NOLDIN, V.F.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.8, n.1, p.63-68, 2005.

CARVALHO, J.E.; Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **Multiciência**, v.7, p.1-18, 2006.

CASTELLANI, T.T.; SANTOS, F.A.M. Abundância, sobrevivência e crescimento de plântulas de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. (Convolvulaceae) na Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v.20, n.4, p.875-885, 2006.

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

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR- UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.

CENTNER, J.; WECK, A. L. **Atlas of immuno-allergology**. Seattle: Hogrefe & Huber Publishers, 1995.

CHEN, X.; ZHAN, Z.J.; ZHANG, X.W.; DING, J.; YUE, J.M. Sesquiterpene lactones with potent cytotoxic activities from *Vernonia chinensis*. **Planta Medica**, v. 71. n.10, p. 949-954, 2005.

CHEN, Z.; LIU, Y-M.; YANG, S.; SONG, B-A.; XU, G-F.; BHADURY, P.S.; JIN, L-H.; HU, D-H.; LIU, F.; X, W.; ZHOU, X. Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* (L) Meeb. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n.1, 1337-1344, 2008.

CHERIGO, L.; PEREDA-MIRANDA, R. Resin Glycosides from the Flowers of *Ipomoea murucoides*. **Journal of Natural Products**, v. 69, 595-599, 2006.

COELHO, F.; FERREIRA, J. **Efeito proliferativo dos extratos de *Ipomoea pes-caprae* e *Rubus imperialis* em células do baço de camundongos estimuladas com fitohemaglutinina**. Monografia (Graduação em Farmácia). Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

COELHO, F.; FERREIRA, J.; ZANDONAI, R. H.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; BUENO, E. C. Proliferative activity of *Ipomoea pes-caprae* and *Rubus imperialis* methanolic extracts on lymphoblastogenesis assay using murine spleen cells stimulated with phytohemagglutinin. In: INTERNATIONAL CONGRESSO F PHARMACEUTICAL SCIENCES, 6., Ribeirão Preto, **Anais**. Ribeirão Preto: CIFARP, 2007.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF/MA, 1984.

COSTA, M.C.; ELEUTÉRIO, I.; RAMOS, S.; ALVES, S.; LEY, S.; CARDOSO, F.; SCHMIDT, R.R. Síntese e avaliação biológica de novas saponinas imunoactivas. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, v.3, n.2, p.191-207, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.72-79, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. 2007. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de novos fármacos. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI, 2007.

CSUPOR-LÖFFLER, B.; HADJÚ, Z.; ZUPKÓ, I.; RÉTHY, B.; FALKAY, G.; FORGO, P.; HOHMANN, J. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines. **Phytotherapy Research**, v. 22, n.12, p. 1697-1702, 2008.

DEBALOGH, K.I.M.; DIMANDE, A.P.; VAN DER LUGT, J.J.; MOLYNEUX, R.J.; NAUDÉ, T.W.; WELMAN, W.G. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p.266-273, 1999.

DE CESARO, F.; SILVA, C.V. BIAVATTI, M.W.; BUENO, E.C. Immunosuppressive activity of the methanolic extract and fractions from *Vernonia scorpioides* on the human mononuclear cells. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF ETHNOPHARMACOLOGY, 10. SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 20. São Paulo, **Anais**. São Paulo: ICE, SBPM, 2008a.

DE CESARO, F.; SILVA, C.V.; CECHINEL FILHO, V.; BUENO, E.C. Evaluation of proliferative activity of the methanolic extract and fractions of *Ipomoea pes-caprae* on the human mononuclear cells. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF ETHNOPHARMACOLOGY, 10. SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 20. São Paulo, **Anais**. São Paulo: ICE, SBPM, 2008b.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DIAZ, G.; NOGUEIRA, M.A.; OLGUIN, C.F.A.; SOMENSI, A.; VIDOTTI, G.J. Estudo fitoquímico e biológico de *Vernonia tweediana* Baker (Asteraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p. 56-61, 2008.

DREUX, E.C. **Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato hidroalcoólico de *Vernonia scorpioides* (Lam.) Persoons em inflamação aguda**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2005.

ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C.; PEREDA-MIRANDA, R. Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p.974-978, 2007.

ESTEVES-SOUZA, A.; SILVA, T. M. S.; ALVES, C. C. F.; CARVALHO, M. G.; BRAZFILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic Activities Against Ehrlich Carcinoma and Human K562 of Alkaloids and Flavonoid from two *Solanum* Species. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 6, p. 838-842, 2002.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, p. 342-348, 2001.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, G.D.;

HUBNER, S.O.; DELLAGOSTIN, O.A.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, p. 1250-1256, 2007.

FLECK, J.D.; KAUFFMANN, C.; SPILKI, F.; LENCINA, C.L.; ROEHE, P.M.; GOSMANN, G. Adjuvant activity of Quilaja brasiliensis saponinas on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 7129-7134, 2006.

FLEISCHER, A.; GHADIRI, A.; DESSAUGE, F.; DUHAMEL, M.; REBOLLO, M.P.; ALVAREZ-FRANCO, F.; REBOLLO, A. Modulating apoptosis as a target for effective therapy. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 1065-1079, 2006.

FREIRE, M.F.I.; ABREU, H.S.; CRUZ, L.C.H.; FREIRE, R.B. Inhibition of fungal growth by extracts of *Vernonia scorpioides*. **Microbiology**, v.27, n.1, 1996.

FULDA, S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 53, n.1, p. 140-146, 2009.

GALATI, G.; TENG, S.; MORIDANI, M.Y.; CHAN, T.S.; O'BREIN, P.J. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v.17, p.311-349, 2000.

GARCÍA, M. **Asociación Ribera Norte – Vernonia scorpioides**. Fev. 2009. Disponível em: <<http://arn.org.br>>. Disponível em: 10 fev. 2009.

GAO, X.; DEEB, D.; DANYLUK, A.; MEDIA, J.; LIU, Y.; DULCHAVSKY, S.A.; GAUTAM, S.C. Immunomodulatory activity of synthetic triterpenoids: inhibition of lymphocyte proliferation, cell-mediated cytotoxicity, and cytokine gene expression through suppression of NF-kappaB. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.30, n.3, p.581-600, 2008.

GOLDIM, J.R. **Pesquisa em Saúde: Leis, normas e diretrizes**. 3 ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: Edefscar, 2003.

HUEZA, I.M.; FONSECA, E.S.M.; PAULINO, C.A.; HARAGUCHI, M.; GORNIK, S.L. Evaluation of immunomodulatory activity of *Ipomoea carnea* on peritoneal cells of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p.181-186, 2003.

HUMPHRIES, M.J.; MATSUMOTO, K.; WHITE, R.; MOLYNEUX, R.J.; OLDEN, K. Augmentation of murine natural killer cell activity by swainsonine, a new antimetastatic immunomodulator. **Cancer Research**, v. 48, p.1410, 1988.

HUO, J.; YANG, S.P.; XIE, B.J.; LIAO, S.G.; LIN, L.P.; DING, J.; YUE, J.M. Cytotoxic sesquiterpenoids from *Vernonia bockiana*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n.5-6, p. 571-575, 2008.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo - CONTAPP. **Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco**. Rio de Janeiro: INCA, 1996.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y; CECHINEL FILHO, V.; ENJO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense* 2. structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 3, p. 368-371, 2003.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1987.

JOSIPOVIC, P.; ORSOLIC, N. Cytotoxicity of Polyphenolic/Flavonoid Compounds in a Leukaemia Cell Culture. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v. 59, n.4, p.299-308, 2008.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**. New York: Sunderland & Sinauer, 1999.

KAMB, A.; LASSOTA, P. Disease models of cancer: apoptosis. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v.1, n.1, p. 31-36, 2004.

KANJWANI, D.G.; MARATHE, T.P.; CHIPLUNKAR, S.V.; SATHAYE, S.S. Evaluation of Immunomodulatory Activity of Methanolic Extract of *Piper betel*. **Scandinavian Journal of Immunology**, n.67, p.589-593, 2008.

KIMURA, S.; ITO, C.; JYOKO, N.; SEGAWA, H.; KURODA, J.; OKADA, M.; ADACHI, S.; NAKAHATA, T.; YUASA, T.; FILHO, V. C.; FURUKAWA, H.; MAEKAWA T. Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. **International Journal of Cancer**, v. 113, p. 158-165, 2005.

KREUGER, M. R. O. ; DALAZEN, P.; MOLON, A. ; BIAVATI, M. . Effects of topical application of extract from *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 82-87, 2005.

KROGH, R.; BERTI, C.; MADEIRA, A.O.; SOUZA, M.M.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R.A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Pharmazie**, v.54, n.6, 1999.

KROGH, R. **Identificação Química e Estudos Farmacológicos dos Constituintes da Espécie *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae). Estudos em Química Medicinal de Análogos do Ácido Gálico**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

KRUEGER, C. L.; PETTRES, M. C.; SIMAS, R.; STEIL, A. A.; SATO, D.; BUENO, E. C. Padronização do teste de linfoproliferação com fitohemaglutinina para estudo da resposta imune celular. In: JORNADA FARMACÊUTICA, 6.; CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM INVESTIGAÇÕES QUÍMICO-FARMACÊUTICAS – CAIQFAR, 6., 2005, Itajaí. **Livro de Resumos**, Itajaí: UNIVALI, 2005. p.13.

LABBÉ, K.; SALEH, M. Cell death in host response to infection. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p.1339-1349, 2008.

LANDIS-PIWOWAR, K.R.; MILACIC, V.; DUO, Q.P. Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.105, n.2. p. 514-523, 2008.

LÉON, I.; ENRÍQUEZ, R.G.; GNECO, D.; VILLARREAL, M.L.; CORTÉS, D.A.; REYNOLDS, W.F.; YU, M. Isolation and Characterization of Five New Tetrasaccharide Glycosides from the Roots of *Ipomoea stans* and Their Cytotoxic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1552-1556, 2004.

LÉON, I.; ENRÍQUEZ, R.G.; NIETO, D.A.; ALONSO, D.; REYNOLDS, W.F.; ARANDA, E.; VILLA, J. Pentasaccharide Glycosides from the Roots of *Ipomoea murucoides*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n.8, p. 1141-1146, 2005.

LI, R.J.; CHEN, C.Y.; LO, W.L. Citotoxic activity of *Ipomoea cairica*. **Natural Products Research**, v.22, n.9, p.747-753, 2008.

LIMA, H. C. Imunologia clínica dos imunomoduladores. In: LIMA, H. C. ed. **Tópicos em Imunodermatologia Clínica**. São Paulo: Segmento Farma; 2004.

LIMA, H. C. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, n. 82, p. 207-221, 2007.

LIU, R.; WANG, J. Effects of quercetin on human laryngeal cancer Hep-2 cells. **Journal of Clinical Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery**, v.22, n.4, p.169-171, 2008.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.;ABADÍA-MOLINA, A.C.; SUÁREZ, M.D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; MEDINA, F.S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p. 495-506, 2008.

LORENZI, H.E.; MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil. Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUGLI, E.; FERRARESI, R.; ROAT, E.; TROIANO, L.; PINTI, M.; NASI, M.; NEMES, E.; BERTONCELLI, L.; GIBELLINI, L.; SALOMONI, P.; COOPER, E.L.; COSSARIZZA, A. Quercetin inhibits lymphocyte activation and proliferation without inducing apoptosis in peripheral mononuclear cells. **Leukemia Research**, v. 33, n.1, 140-150, 2009.

MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismo de resposta immune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n.6, p.647-664, 2004.

MACHADO JR, J.C.; FLORÃO, A.; MATTANA, F.VR.; ROCHA, F.H.; SANTOS, C.A.M.; WEFFORT-SANTOS, A.M. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.16, p.645-655, 2006.

- 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. Immunomodulatory activities of *Clausena excavate* Burm. f. wood extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 155-160, 2003.
- MANUELE, M.G.; FERRARO, G. ANESINI, C. Effect of *Tilia x viridis* flower extract on the proliferation of a lymphoma cell line and on normal murine lymphocytes: contribution of monoterpenes, especially limonene. **Phytotherapy Research**, v. 22, n.11, p. 1520-1526, 2008.
- MANUELE, M.G.; ARCOS, M.L.; DAVICINO, R.; FERRARO, G.; CREMASCHI, G.; ANESINI, C. Mechanism of the antiproliferative action of limonene on a lymphoma cell line: participation of nitric oxide, antiproliferative action of limonene on a lymphoma cell line. **Phytotherapy Research**, v. 23, n.1, p.140-146, 2009.
- MARTINS-FILHO, O. A.; MELLO, J. R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R. The spleen is an important site of T cell activation during human hepatosplenic schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p. 159-164, 1998.
- MELNIKOVA, I.; GOLDEN, J. Apoptosis-targeting therapies. **Nature Review Drug Discovery**, v.3, n.11, p. 905-906, 2004.
- MENDES, A.K.B. **Avaliação da atividade biológica imunomoduladora *in vitro* de extratos e substâncias isoladas de *Vernonia scorpioides***. Monografia (Graduação em Farmácia). Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.
- MENDES, A.M.C. **Triterpenos e atividade imunossupressora de *Vernonia scorpioides* Pers. (*Asteraceae*)**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2001.
- MENDES, A.K.B.; COELHO, F.; FERREIRA, J.; SILVA, C.V.; DUARTE, B.M.; FELIPPE, M.E.; ZANDONAI, R.H.; BIAVATTI, M.W.; BUENO, E.C. Evaluation of the *in vitro* immunomodulatory activity of *Vernonia scorpioides* methanolic extract. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES. 6., Ribeirão Preto, **Anais**. Ribeirão Preto: CIFARP, 2007.
- MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n.11, p.757-766, 1991.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NERGARD, C.S.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T.E.; MALTERUD, K.E.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H.; PAULSEN, B.S. Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 141-152, 2004.

NERGARD, C.S.; MATSUMOTO, T.; INNGJERDINGEN, M.; INNGJERDINGEN, K.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S.E.; MICHAELSEN, T.E.; DIALLO, D.; KIYOHARA, H.; PAULSEN, B.S.; YAMADA, H. Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp (*Asteraceae*). **Carbohydrate Research**, v. 340, n.1, p. 115-130, 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p.461-477, 2007.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. 2003. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.

OHBA, H.; MORIWAKI, S.; RUMIANA, B.; YASUDA, S.; YAMASAKI, N. Plant-derived abrin-a induces apoptosis in cultured leukemic cell lines by different mechanisms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p.182-193, 2004.

OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua distribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitoquímica Científica**, v.1, p. 49-58, 2003.

PAGNO, T.; BLIND, L.Z.; BIAVATTI, M.W.; KREUGER, M.R.O. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (*Asteraceae*) against Ehrlich's tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p. 1483-1491, 2006.

PANDIMA DEVI, K.; SAI RAM, M.; SREEPRIYA, M.; ILAVAZHAGAN, G.; DEVAKI, T. Immunomodulatory effects of *Premna tomentosa* extract against Cr (VI) induced toxicity in splenic lymphocytes – an in vitro study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 105-108, 2003.

PARHAM, P. **O sistema imune**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

PARK, S-D.; LAI, Y-S.; KIM, C-H. Immunopotentiating and antitumor activities of the purified polysaccharides from *Phellodendron chinese* SCHNEID. **Life Sciences**, v. 75, p. 2621-2632, 2004.

PATWARDHAN, B.; KALBAG, D.; PATKI, P.S.; NAGSAMPAGI, B.A. Search of immunomodulatory agents: a review. **Indian Drugs**, v. 28, n. 2, p. 348-358, 1990.

PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 5<sup>th</sup> ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

PELUZIO, M.C.G.; VOLP, A.C.P.; QUEIROZ, I.C.; BRITO, C.J.; MIRANDA, T.C. As proteínas supressoras em neoplasias malignas – conhecendo seu papel. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, n.3, p.233-8, 2006.

PEREDA-MIRANDA, R.; ESCALANTE-SANCHEZ, E.; ESCOBEDO-MARTINEZ, C. Characterization of Lipophilic Pentasaccharides from Beach Morning Glory (*Ipomoea pes-caprae*). **Journal of Natural Products**, v. 68, p.226-230, 2005.

PEREIRA, R.S.; UMITA, T.C.; FURLAN, M.R. JORGE, A.; VENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**, v. 38, n. 2, 2004.

PÉREZ-TOMÁS, R.; MONTANER, B.; LLAGOSTERA, E.; SOTO-CERRATO, V. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1447-1452, 2003.

PERRY, E. *Ipomoea pes-caprae*. Disponível em:<[http://www.seabean.com/guide/lpomoea\\_pes-caprae/index.htm](http://www.seabean.com/guide/lpomoea_pes-caprae/index.htm)>. Acesso em: 28 ago. 2007.

PHILIPPI, M.E. **Avaliação do efeito de extratos de plantas da flora catarinense sobre a proliferação de células mononucleares humanas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.

PHILLIPSON, J.D. 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Medica**, v. 69, p. 491-495, 2003.

PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.12, n.1, 1986.

PILARSKI, R.; POCZEKAJ-KOSTRZEWSKA, M.; CIESIOLKA, D.; SZYFTER, K.; GULEWICZ, K. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Pharmacological Reports**, v. 59, n.1, p.565-572, 2007.

PONGPRAYOON, U.; BOHLIN, L.; SANDBERG, F.; WASUWAT, S. Inhibitory effect of extract of *Ipomoea pes-caprae* on guinea-pig ileal smooth muscle. **Acta Pharmaceutica Nórdica**, v.1, n. 1, p. 41-44, 1989.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTROM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTROM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of  $\beta$ -damascenone and e-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Medica**, v.58, n.1, p.19-21, 1992.

PRASAD, S.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Induction of apoptosis by lupeol and mango extract in mouse prostate and LNCaP cells. **Nutrition and Cancer**, v.60, n.1, p. 120-130, 2008.

PRASAD, S.; NIGAM, N.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v.47, n.12, p. 916-924, 2008.

PUREN, A.J.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C.A. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1b are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 2256–2261, 1999.

RAJPUT, Z.I.; HU, S-H.; XIAO, C-W.; ARIJO, A.G.; Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, n.3, p. 153-161, 2007.

RAUH, L. K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RINK, L.; NICKLAS, W.; ALVAREZ-OSSORIO, L.; KOESTER, M.; KIRCHNER, H. Differential induction of tumor necrosis factor alpha in murine and human leukocytes by Mycoplasma arthritidis-derived superantigen. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 462-467, 1994.

RISCO, E.; GHIA, F.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; ALVAREZ, E.; CANIGUERAL, S. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta Medica**, v.69, n.9, p. 785-794, 2003.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; WARRS, E.T. **Farmacognosia e biotecnologia**, São Paulo: Premier, 1997.

ROBBINS, S.T.; COTRAN, R.S. **Patologia. Bases Patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROCHA, K.C.; GORESCU, R. A.G.; BELTRAME, R. L. 2007. Metodologia laboratorial para estudo da resposta imune celular. In: VAZ, A. J.; KIOKO, T.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999.

ROSEGHINI, R.; MOREIRA, P.; VALE, V.; PINHEIRO, A.M.; COSTA, J.F.; BITTENCOURT, T.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; VELOZO, E.; EL-BACHÁ, R.; MEYER, R.; FREIRE, S. Different effects of arborinine alkaloid obtained from Brazilian *Erthela baihensis* on spleen and thymus cells stimulated in vitro with different mitogens. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.28, n.2, p. 361-376, 2006.

RZESKI, W.; STEPULAK, A.; SZYMANSKI, M.; SIFRINGER, M.; KACZOR, J.; WEJKSZA, K.; ZDZISINSKA, B.; KANDERFER-SZERSZEN, M. Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.374, n. 1, p. 11-20, 2006.

- SALEEM, M.; MADDODI, N.; ABU ZAID, M. KHAN, N.; BIN HAFEEZ, B.; ASIM, M.; SUH, Y.; YUN, J.M.; SETALURI, V.; MUKHTAR, H. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro e in vivo by inducing apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n.1, p. 2119-2127, 2008.
- SCHULAK, J.A. Steroid immunosuppression in kidney transplantation : a passing era. **Journal of Surgical Research**, v. 117, n.1, p. 154-162, 2004.
- SCHWARZ, A.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M.; DAGLI, M.L.Z.; SPINOSA, H.S. Effects of *Ipomoea carnea* aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development of rat offspring. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 615-626, 2003.
- SCHWARZ, A.; HOSOMI, R.Z.; HENRIQUE, B.S.; HUEZA, I.; GARDNER, D.; HARAGUCHI, M.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Identificação de princípios ativos presentes na *Ipomoea carnea* brasileira. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n.2, p.181-187, 2004.
- SEGALEN, J.J. *Ipomoea pes-caprae*. Disponível em:< [http://www.exot-nutzer.de/images/prod\\_images/Ipomoea\\_pes\\_caprae.jpg](http://www.exot-nutzer.de/images/prod_images/Ipomoea_pes_caprae.jpg)>. Acesso em: 28 ago. 2007.
- SHIMODA, H.; MATSUDA, H.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. Immunomodulatory activities of thunberginol A and related compounds on lymphocyte proliferation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, p. 809-813, 1998.
- SILVA, J.B.C.; LOPES, C.A.; MAGALHÃES, Z.J. 2002. Cultura da batata-doce. In: CEREDA, M.P. **Agricultura: tuberosas amiláceas latino americana**. São Paulo: Cargill, 2002.
- SILVERSTEIN, A. M. **A history of immunology**. San Diego: Academic Press, 1989. 422 p.
- SIMÕES, C. M. O. Implementação do serviço de informações sobre plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos junto ao Centro de informações toxicológicas de Santa Catarina – CIT/HU/UFSC, **4ª SEMANA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (SEPEX)**, Florianópolis, 2000.
- SOUZA, M. M.; SCHLEMPER, V.; JESUS, R.; CECHINEL FILHO, V. Analgesic profile of hidroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 111-113, 1998.
- SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C. ; KROGH, R.; YUNES, R. A; CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p.85-90, 2000.
- STAHNKE, K.; FULDA, S.; FRIESEN, C.; STRAUB, G.; DEBATIN, K.M. Activation of apoptosis pathways in peripheral blood lymphocytes by in vivo chemotherapy. **Blood**, v. 98, n. 10, p.3066-3073, 2001.

SUNILA, E. S; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 339-346, 2004.

TERAMACHI, F.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKORN, T.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; ISHIBASHI M. Collagenase Inhibitory Quinic Acid Esters from *Ipomoea pes-caprae*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p.794-796, 2005.

TOIGO, L.; OLIVEIRA, R.F.; OLIVEIRA, F.; MARQUES, M.O.M. Caracterização farmacobotânica, estudo do óleo essencial e atividade antimicrobiana da erva de São Simão, *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n.2, p.49-55, 2004.

TOMASICH, F.D.S.; VALLADARES, G.C.G.; DEMARCHI, V.C.A.; GAGLIARDI, D. Influência no tratamento neoadjuvante na morbi-mortalidade das esofagectomias. **Revista Associação Médica**, v. 49, n.3, p. 300-305, 2003.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VÍTOR, J.M.B. **Linfócitos normais, hemáceas e plaquetas no esfregaço sanguíneo com coloração May-Grunwald Giemsa**. Disponível em: <<http://www.ff.ul.pt/paginas/jvitor/Labio/2prot.html>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

WAGNER, H. Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity (recent advances). **Pure and Applied Chemistry**, v.62, n.7, p.1217-1222, 1990.

WAGNER, H. 2007. Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI, 2007.

WATSON, A.A.; FLEET, G.W.J.; ASANO, N.; MOLYNEUX, R.J.; NASH, R.J. Polyhydroxylated alkaloids – natural occurrence and therapeutic applications. **Phytochemistry**, v.56, p.265-295, 2001.

WILASRUSMEE, C.; KITTUR, S.; SIDDIQUI, J.; BRUCH, D.; WILASRUSMEE, S.; KITTUR, D.S. In Vitro Immunomodulatory Effects of Ten Commonly Used Herbs on Murine Lymphocytes. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.8, n.4, p.467-475, 2002.

WILLIAMS, R.B.; NORRIS, A.; SLEBODNICK, C.; MEROLA, J.; MILLER, J.S.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RAS MISON, V.E.; KINGSTON, D.G.I. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia pachyclada* from the Madagascar rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 68, n.9, p.1371-1374, 2005.

WILLIMOTT, S.; BARKER, J.; JONES, L.A.; OPARA, E.I. Apoptotic effect of *Oldenlandia diffusa* on the leukaemic cell line HL60 and human lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n.1, p. 290-299, 2007.

WON, H.J.; HAN, C.H.; KIM, Y.H.; KWON, H.J.; KIM, B.W.; CHOI, J.S.; KIM, K-H.

Induction of apoptosis in human acute leukemia jurkat T cells by *Albizzia julibrissin* extract is mediated via mitochondria-dependent caspase-3 activation. **Journal of Ethnofarmacology**, v.106, n.1, p.383-389, 2006.

XU, H. X.; LEE, S. H.; LEE, S. F.; WHITE, R. L.; BLAY, J. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. **Antiviral Research**, v. 44, p. 43-54, 1999.

YASNI, S.; YOSHIIE K.; ODA H.; SUGANO M.; IAMIZUMI K. Dietary *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. increases mitogenic responses of splenic lymphocytes in rats, and alters populations of the lymphocytes in mice. **Journal of Nutricional Science and Vitaminology**, v.39, n. 4, p. 345 – 354, 1993.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. 2007. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI, 2007.

ZANDONAI, R.H. **Análise da atividade linfoproliferativa de células esplênicas murinas frente a extrato de seis plantas medicinais da flora catarinense**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

ZHAO, G.; KAN, J.; LI, Z.; CHEN, Z. Characterization and immunostimulatory activity of ((1→ 6)- $\alpha$ -D-glucan) from the root of *Ipomoea batatas*. **International Immunopharmacology**, v.5, p.1436-1445, 2005.

# 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](#)