



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Atividade imunomodulatória do extrato aquoso obtido  
da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* Kunth no  
timo de camundongos**

Larissa Fernanda de Araújo Vieira

Maceió, 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Larissa Fernanda de Araújo Vieira

**Atividade imunomodulatória do extrato aquoso obtido da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* Kunth no timo de camundongos**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Salete Smaniotto

Maceió, 2010

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto**

V657a Vieira, Larissa Fernanda de Araújo.  
Atividade imunomodulatória do extrato aquoso obtido da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* Kunth no timo de camundongos / Larissa Fernanda de Araújo Vieira. – 2010.  
82 f. : il., grafs.

Orientador: Salete Smamiotto.  
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2010.

Bibliografia: f. 74-82.

1. Sucupira (*Bowdichia virgilioides*). 2. Timo. 3. Matriz extracelular. 4. Imunossupressão. I. Título.

CDU: 57.083.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Larissa Fernanda de Araújo Vieira, intitulado: "Atividade imunomodulatória do extrato aquoso obtido da casca do caule da *Browdichia virgilioides* Kunth no timo de camundongos", orientada pela Profa. Dra. Salete Smaniotto, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 02 de março de 2011.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram a candidata aprovada.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Daniella Arêas Mendes da Cruz - (IOC/Fiocruz RJ)

Profa. Dra. Alessandra Abel Borges - (ICBS - UFAL)

Prof. Dr. Renato Santos Rodarte - (ICBS - UFAL)

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS, da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Salete Smaniotto.

Dedico este trabalho a minha querida *mãe Tereza Araújo* e ao meu saudoso *Tio Dadá (Pe. Darci Leite)*. Todo meu reconhecimento e carinho, as duas pessoas que mais contribuíram para minha formação moral e acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, O Maior entre todos os meus amigos, Aquele que sempre amparou a minha vida com uma imensa Misericórdia. Obrigada Senhor, por tantas vezes me conduzir em Teus braços e me fazer enxergar que as pegadas que eu via na areia eram Suas!

A minha mãe *Tereza Araújo*, por sempre sonhar os meus sonhos, por me amar e apoiar sem limites. Saibas que em muitos momentos eu consegui sentir na terra o grandioso amor de Deus através do seu amor.

Ao meu filho *Nickolas Sales*, por me apresentar a mais pura e gratuita forma de amar. Em vários momentos de dificuldade, o seu sorriso renovou as minhas forças. Eu te amo, meu amor!

Ao meu grande amor, meu esposo *Écio Matias*, por toda ajuda, críticas e sugestões, principalmente, na etapa final dessa jornada. Saibas que eu consigo enxergar o seu amor em cada um desses gestos. Obrigada por ter entendido o quanto esse mestrado é importante para mim!

A minha avó *Lourdes Leite*, por sempre me achar melhor do que eu realmente sou e principalmente, por todas as orações, carinho e amor.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> *Salette Smaniotto*, exemplo de compromisso, responsabilidade e amor a pesquisa. Obrigada por toda disponibilidade, paciência, respeito e carinho com que sempre me tratastes. Tenho o maior orgulho em dizer que sou tua orientanda. A ti toda minha admiração!

A Prof<sup>a</sup> *Sílvana Ayres*, obrigada por estar sempre pronta a ajudar, cheia de bom-humor e alegria. Tantas vezes fostes aquela VOZ amiga a acalantar o meu coração em momentos de dificuldade. Muito Obrigada por tamanha generosidade!

A Prof<sup>a</sup> *Leonora Bastos*, obrigada por todos os ensinamentos acadêmicos e também pelos de vida. Apesar de não estarmos perto fisicamente, o que me faz muita falta, o meu carinho por você permanece o mesmo.

Ao Prof<sup>o</sup> *Emiliano Barreto*, por sua valiosa contribuição, colaboração, sugestão e incentivo no decorrer de todo trabalho.

A minha querida amiga *Danielma Reis*, que me acolheu com tanto carinho no laboratório e sempre ofertou sua ajuda de maneira tão simples e generosa. Elma, desde a primeira vez que eu te vi, sabia que seríamos grandes amigas. Com certeza essa batalha foi mais suave por você estar ao meu lado. Sentirei muito a sua falta! Obrigada por tudo!

Ao meu grande amigo *Altair Brandão*, ser humano maravilhoso de uma generosidade sem igual. Obrigada meu amigo, por toda disponibilidade e valiosa colaboração para execução desse trabalho e de maneira especial, muito obrigada por ser esse AMIGO de todas as horas.

Aos amigos *Rebeka Melo*, *Betijane Soares*, *Rafael Vital*, *Iana Viana*, *Jamylle Ferro* e *Isabela Agra*, pelo apoio e incentivo no decorrer desses anos. É muito bom poder contar com o carinho e a amizade de vocês!

A amiga *Juliane Silva*, que com muita generosidade me apresentou a “menina dos nossos olhos”, *Bowdichia virgilioides*, e também pelo apoio indispensável no manuseio do citômetro de fluxo.

As amigas *Fátima Maia* e *Delma Paz*, pelos ensinamentos durante o processamento histológico. Fico muito feliz pela amizade que construímos!

A toda *família* que compõe o *Laboratório de Biologia Celular*, por fazer do nosso local de trabalho um ambiente competente e produtivo, mas acima de tudo, harmonioso e fraterno. Muito Obrigada a todos e a cada um de vocês!

Aos órgãos de fomento *CNPq*, *CAPES* e *FAPESP* pelo apoio financeiro.



## RESUMO

A espécie vegetal *Bowdichia virgilioides* Kunth, popularmente conhecida como “sucupira”, é usada pela medicina popular regional como tratamento para gota, inflamação e doenças auto-imune. No entanto, poucos estudos científicos tratam da sua atividade biológica, principalmente no que diz respeito ao sistema imunológico, o que torna essa espécie um alvo em potencial de investigações científicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vivo* a ação do extrato aquoso da casca do caule de *B. virgilioides* (EABv) sobre o timo. Para esse estudo, foram utilizados camundongos C57BL6 (4-5 semanas) machos, aos quais foi administrado por via oral o EABv durante 7 dias consecutivos. Inicialmente, por análise histológica demonstrou-se que o tratamento com EABv alterou a morfologia do timo, além de reduzir significativamente o peso do órgão e o número total de timócitos. Verificou-se por citometria de fluxo que essa redução ocorreu nos timócitos de fenótipo duplo-positivo ( $CD4^+CD8^+$ ) e simples positivo para CD4 ( $CD4^+CD8^-$ ) e CD8 ( $CD4^-CD8^+$ ). Além disso, por imunofluorescência indireta, foi observada a presença de moléculas da matriz extracelular no timo, onde se evidenciou um aumento na deposição de laminina e fibronectina nos animais tratados com o EABv quando comparado ao grupo controle. No entanto, a análise por citometria demonstrou que o EABv não foi capaz de interferir na expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 na superfície dos timócitos. Ainda, o EABv diminuiu a adesão dos timócitos frente à laminina e essa redução ocorreu tanto nas subpopulações imaturas ( $CD4^-CD8^-$  e  $CD4^+CD8^+$ ) como nas maduras ( $CD4^+CD8^-$  e  $CD4^-CD8^+$ ). Ensaio de migração em câmaras de *transwell* revelaram que esse extrato reduziu a migração dos timócitos frente à laminina e, por citometria de fluxo, verificou-se que essa diminuição ocorreu principalmente nas células duplo-positivas. Em conjunto, os resultados mostram que o EABv interfere no sistema imunológico reduzindo o peso do timo e o número total de timócitos, além de modular negativamente a adesão e a migração dessas células, sugerindo assim sua atuação como uma substância imunossupressora.

**Palavras-chaves:** *Bowdichia virgilioides*, timo, matriz extracelular, imunossupressão.

## ABSTRACT

The plant species *Bowdichia virgilioides* Kunth, popularly known as "sucupira", is used by regional folk medicine as a treatment for gout, inflammation and autoimmune diseases. However, few scientific studies dealing with its biological activity, especially with regard to the immune system, making this species a potential target for scientific investigation. The aim of this study was to evaluate *in vivo* the action of aqueous extract of the stem bark of *B. virgilioides* (EABv) on the thymus. For that, male C57BL6 mice (4-5 weeks) were used and treated orally for 7 days with EABv. Initially, histological examination revealed that treatment with EABv change the morphology of the thymus, and significantly reduces organ weight and total thymocyte numbers. It was found by flow cytometry that this reduction occurred in double-positive thymocyte (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) and single positive thymocyte (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>). Furthermore, by indirect immunofluorescence, we observed an enhancement in laminin and fibronectin deposition in the thymus of EABv-treated animals compared with control group. However, cytometric analysis showed that EABv was not able to influence the expression of integrin receptors VLA-5 and VLA-6 on the surface of thymocytes. Moreover, thymocyte adhesion to laminin was diminished in EABv-treated animals and this reduction occurred in immature (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) cells and mature (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) cells. Lastly, thymocyte migration was measured using transwell chambers and revealed that this extract reduced thymocytes migration driven by laminin and that this decline occurred mainly in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells. These results show that the EABv interfere in the immune system by reducing the weight of the thymus and the total thymocyte numbers, in addition to negatively modulate the adhesion and migration of these cells, suggesting its role as an immunosuppressive substance.

Keywords: *Bowdichia virgilioides*, thymus, extracellular matrix, immunosuppression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Microambiente tímico.....	24
Figura 2. Diferenciação intratímica de células T .....	28
Figura 3. Organização da matriz extracelular (MEC) .....	30
Figura 4. <i>Bowdichia virgilioides</i> .....	36
Figura 5. Morfologia do timo.....	45
Figura 6. Efeito do EABv sobre o peso relativo do timo.....	46
Figura 7. Efeito do EABv sobre o número de timócitos.....	46
Figura 8. Efeito do EABv sobre o número de timócitos CD4/CD8.....	48
Figura 9. Efeito do EABv na deposição de moléculas da matriz extracelular.....	49
Figura 10. Efeito do EABv na expressão de integrinas na superfície dos timócitos.....	51
Figura 11. Efeito do EABv sobre o número de timócitos aderentes.....	52
Figura 12. Efeito do EABv sobre o fenótipo CD4/CD8 de timócitos aderentes.....	53
Figura 13. Efeito do EABv sobre a expressão da integrina VLA-5 na superfície de timócitos aderentes.....	55
Figura 14. Efeito do EABv sobre a expressão da integrina VLA-6 na superfície de timócitos aderentes.....	56
Figura 15. Efeito do EABv sobre o número de timócitos migrantes.....	57
Figura 16. Efeito do EABv sobre o fenótipo CD4/CD8 de timócitos migrantes.....	58
Figura 17. Efeito do EABv na expressão da integrina VLA-5 na superfície de timócitos migrantes.....	59
Figura 18. Efeito do EABv na expressão da integrina VLA-6 na superfície de timócitos migrantes.....	60
Figura 19. Efeito do EABv sobre a massa corpórea de camundongos.....	61
Figura 20. Efeito do EABv sobre o fígado de camundongos.....	62

## LISTA DE ABREVIATURA

APC: alofococianina (*allophycocyanin*)

BSA: albumina sérica bovina (*bovine serum albumine*)

C57BL/6: linhagem de camundongos, Black C57

CD: marcadores de superfície celular (*clusters of differentiation*)

CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>: timócito duplo-negativo para as moléculas CD4 e CD8

CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>: timócito duplo-positivo para as moléculas CD4 e CD8

CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>: timócito simples-positivo para a molécula CD4

CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>: timócito simples-positivo para a molécula CD8

CTR: grupo controle

DC: células dendríticas (*dendritic cells*)

EABv: extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides*

FGF: fator de crescimentos de fibroblasto

FITC: isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)

FN: fibronectina

FoxN1: fator de transcrição (forkhead Box N1)

GAR: anticorpos de cabra contra coelho (*goat anti rabbit*)

GH: hormônio do crescimento (*growth hormone*)

HE: hematoxilina e eosina

IL: interleucina

LN: laminina

MEC: matriz extracelular

MHC: complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex*)

NK: células *natural killer*

NOD: diabético não obeso (*non-obese diabetic*)

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAMPs: padrões moleculares associados à patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)

PBS: solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*)

PE: ficoeritrina (*phycoerythrin*)

PercP: proteína peridina de clorofila (*peridinin-chlorophyll-a-protein*)

RGD: arginina-glicina-ácido aspártico

RNAm: ácido ribonucleico (*ribonucleic acido*) mensageiro

RPMI: mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e outras substâncias necessárias ao crescimento celular desenvolvida pelo Roswell Park Memorial Institute

SBF: soro bovino fetal

TCR: receptor de células T (*T cell receptor*)

TECs: células epiteliais tímicas (*thymic epithelial cells*)

TNC: célula *nurse* tímica (*thymic nurse cell*)

VLA: antígeno de superfície tardio (*very late antigen*)

VLA-4:  $\alpha 4\beta 1$  ou CD49d/CD29, receptor de fibronectina

VLA-5:  $\alpha 5\beta 1$  ou CD49e/CD29, receptor de fibronectina

VLA-6:  $\alpha 6\beta 1$  ou CD49f/CD29, receptor de laminina

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>Revisão de Literatura .....</b>	<b>19</b>
3.1	Sistema Imunológico .....	20
3.2	Timo.....	22
3.2.1	Microambiente tímico.....	23
3.2.2	Diferenciação e migração intratímica de células T.....	26
3.2.3	Matriz extracelular e integrinas.....	29
3.3	Uso de plantas medicinais.....	32
3.3.1	Considerações sobre a família Fabaceae, o gênero <i>Bowdichia</i> e a espécie <i>Bowdichia virgilioides</i> .....	33
<b>4.</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>37</b>
4.1	Animais.....	38
4.2	Material vegetal .....	38
4.3	Preparo do extrato.....	38
4.4	Tratamento <i>in vivo</i> com <i>B. virgilioides</i> .....	39
4.5	Histologia convencional .....	39
4.6	Peso e celularidade do timo.....	40
4.7	Análise por citometria de fluxo.....	40
4.8	Ensaio de imunofluorescência .....	41
4.9	Ensaio de adesão.....	41
4.10	Ensaio de migração.....	42
4.11	Avaliação do Efeito do EABv sobre parâmetros toxicológicos .....	43
4.12	Análise estatística.....	43

<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>44</b>
5.1	Efeito do tratamento com EABv na morfologia, peso relativo e celularidade do timo de camundongos .....	45
5.2	Efeito do EABv sobre ligantes e receptores de matriz extracelular no timo de camundongos.....	47
5.3	Efeito do EABv sobre a adesão dos timócitos.....	50
5.4	Efeito do EABv sobre a migração dos timócitos.....	54
5.5	Avaliação do potencial tóxico do EABv.....	61
<b>6.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão e Perspectivas.....</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>Referências.....</b>	<b>74</b>

## *1. Introdução*

---



O timo é um órgão linfóide primário onde os precursores de células T, derivados da medula óssea, sofrem um complexo processo de diferenciação e migração. Ao terminarem seu processo de diferenciação, tais células migram para áreas de células-T dependentes dos órgãos linfóides periféricos (ANDERSON & JENKINSON, 2001; AHAMED & MADHIVADHANI, 2010).

Entre os principais componentes do timo, os elementos da matriz extracelular atuam em conjunto com as células do microambiente tímico, definindo os distintos nichos intratímicos e proporcionando os sinais necessários para a migração direcionada e conseqüente maturação dos timócitos (CIOFANI & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

Acredita-se que falhas no processo de migração e maturação dos timócitos possam levar ao aparecimento de deficiências na atividade imunológica e um desequilíbrio da homeostasia, favorecendo, portanto, o desenvolvimento e/ou a amplificação de diversas doenças, incluindo as infecciosas, auto-imunes e câncer (SAVINO & DARDENNE, 2000; SAVINO *et al.*, 2004). No tratamento dessas imunodeficiências estão formas de imunoterapia que visam o desenvolvimento de substâncias capazes de ativar as células do sistema imune. Em contrapartida, a capacidade técnica de efetuar transplantes bem sucedidos de órgãos, criou um forte ímpeto pelo desenvolvimento de esquemas imunossupressores eficazes e que permitam evitar a rejeição ao enxerto. Além disso, várias doenças consideradas decorrentes de respostas imunológicas aberrantes são passíveis de tratamento com agentes capazes de inibir a resposta imunológica, o que tem estimulado a pesquisa de novos fármacos (STITES *et al.*, 2000).

As plantas são uma fonte potencial de medicamentos e substâncias químicas com propriedades úteis na modulação do sistema imune. Atividades imunoestimuladoras ou imunossupressoras vem sendo investigadas nas plantas e em seus constituintes isolados, principalmente devido ao grande número de espécies vegetais utilizadas na medicina popular para o tratamento

de doenças que comprometem o sistema imunológico (PATWARDHAN & GAUTAM, 2005).

Nesse contexto, destaca-se a *Bowdichia virgilioides* Kunth, espécie amplamente utilizada pela medicina popular, para o tratamento de diversas enfermidades, a exemplo de doenças auto-imunes, inflamações, artrite, diarreia, gota e como cicatrizante (ALMEIDA *et al.*, 2006; BARROS *et al.*, 2010). No entanto, poucos estudos científicos tratam da sua atividade biológica, principalmente no que diz respeito ao sistema imunológico, o que torna essa espécie um alvo em potencial de investigações científicas.

## 2. Objetivos

---

## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vivo* os efeitos do extrato aquoso da casca do caule de *Bowdichia virgilioides* sobre o timo de camundongos.

## 2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a influência do extrato aquoso de *B. virgilioides* sobre o peso, a morfologia e a celularidade do timo de camundongos;
2. Verificar o efeito do extrato aquoso de *B. virgilioides* na produção de moléculas da matriz extracelular no microambiente tímico de camundongos;
3. Investigar a influência do extrato aquoso de *B. virgilioides* no fenótipo CD4/CD8 dos timócitos;
4. Verificar o efeito do extrato de *B. virgilioides* na expressão de receptores de moléculas da matriz extracelular nos timócitos de camundongos;
5. Avaliar a influência do extrato de *B. virgilioides* na capacidade de adesão dos timócitos frente a moléculas da matriz extracelular;
6. Analisar o efeito do extrato de *B. virgilioides* na capacidade migratória de timócitos, frente a moléculas da matriz extracelular;
7. Verificar o potencial tóxico do extrato de *B. virgilioides*.

### *3. Revisão de Literatura*

---

### 3.1 Sistema imunológico

O sistema imunológico é composto por órgãos, células especializadas e moléculas solúveis que têm a finalidade de reconhecer os elementos estranhos ao organismo e elaborar uma reação dirigida a esses antígenos, com a finalidade de eliminá-los do organismo e preservar a saúde (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

O desenvolvimento fisiológico do sistema imune tem início ainda na vida intra-uterina com a hematopoiese ocorrendo no saco vitelino, seguido do fígado fetal e, posteriormente, durante a vida pós-natal, com a medula óssea assumindo a produção das células. A divisão celular em precursores linfóides e mielóides constitui o primeiro passo na diferenciação das células do sistema imunológico. Os precursores linfóides originam os linfócitos T e B e as células *natural killers* (NK), enquanto os precursores mielóides originam os eritrócitos, plaquetas, monócitos, células dendríticas, neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Os linfócitos T e B são as células responsáveis pela resposta imune adaptativa, enquanto que as demais populações celulares participam tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa (HERZYK & GORE, 2004).

A resposta imune inata é a resposta inicial aos microrganismos, e inclui barreiras físicas (epitélio) e químicas (saliva, lágrima), células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos) e proteínas presentes no sangue, tais como elementos do sistema complemento e as citocinas. As células envolvidas na imunidade inata reconhecem padrões moleculares altamente conservados nos patógenos (PAMPs). As bactérias e protozoários são combatidos pela resposta imune inata via ativação de células fagocíticas, que capturam os organismos extracelulares e os digerem pela ação de mieloperoxidase, lisozimas, defensinas, lactoferrina e a produção dos reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio. Os microrganismos também ativam a via alternativa do sistema complemento, que é capaz de estimular a fagocitose, quimiotaxia das células imunes, produção e liberação de mediadores farmacológicos dos mastócitos e lise direta do organismo invasor. Os microrganismos intracelulares também são

destruídos por inúmeros mecanismos, uma vez que, a infecção viral de uma célula induz à produção de interferon, tornando as células vizinhas resistentes a infecção. (HOWARD *et al.*, 1992; TURVEY & BROIDE, 2010). Após o reconhecimento dos PAMPs, os macrófagos e as células NK secretam citocinas que ativam os fagócitos e estimulam a inflamação, recrutando outras células para o sítio da infecção e também iniciando a resposta imune adaptativa (BOEHM & BLEUL, 2007;).

A imunidade decorrente da resposta imune adaptativa pode ser subdividida em duas: celular e humoral. A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T, que são capazes de destruir células infectadas por vírus ou bactérias intracelulares, nesse caso a resposta imune é realizada pelos linfócitos T CD8, os linfócitos citotóxicos, cujos receptores reconhecem especificamente as proteínas virais produzidas na célula infectada e em associação com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I do hospedeiro (HOWARD *et al.*, 1992). Os microrganismos intracelulares, quando no interior de células apresentadoras de antígeno, também podem ser destruídos por linfócitos T CD4, os linfócitos T auxiliares, cujos receptores reconhecem antígenos estranhos apresentados pelas moléculas MHC de classe II das células de defesa do hospedeiro (ANDERSON *et al.*, 1996). A imunidade humoral é mediada pelos anticorpos produzidos pelos linfócitos B que reconhecem especificamente os antígenos microbianos, marcando-os para eliminação (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Os órgãos linfóides desempenham um papel fundamental na imunidade, pois são nestes locais onde os linfócitos interagem com células não linfóides importantes para o seu processo de maturação, para iniciar a resposta imune adaptativa ou para sua sobrevivência e manutenção. Tais órgãos podem ser divididos em órgãos linfóides centrais ou primários, nos quais são gerados ou amadurecidos os linfócitos, e órgãos linfóides periféricos ou secundários, que iniciam as respostas adaptativas e onde são mantidos os linfócitos. Nos mamíferos, os órgãos linfóides primários são a medula óssea e o timo. Tanto os precursores de células B como os precursores de células T originam-se na medula óssea, mas apenas as células pré-B amadurecem nesse órgão,

enquanto que, os precursores de células T migram para o timo, onde sofrem o processo de maturação (JANEWAY *et al.*, 2007).

### 3.2 Timo

O timo é o primeiro órgão linfóide a aparecer durante a ontogênese e, no ser humano, os dois primórdios laterais de tecido tímico surgem no final da quarta semana de vida embrionária (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

Durante a embriogênese em camundongos, no 10<sup>o</sup> dia do desenvolvimento embrionário (E10), o primórdio tímico é formado do endoderma derivado da terceira bolsa faríngea, um processo que depende da interação com as células mesenquimais derivadas da crista neural (GORDON *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007). Aproximadamente no dia E11.5, o rudimento tímico começa a brotar e crescer. No dia E12.5, surgem as primeiras células epiteliais tímicas (TECs), em um processo independente de timócitos (GRAY *et al.*, 2005). A colonização do rudimento tímico pelos precursores hematopoiéticos acontece antes da vascularização, por volta do dia E13.5, pois o primórdio tímico produz fatores quimioatraentes capazes de atrair essas células, que penetram no rudimento tímico via transmigração através das camadas mesenquimais adjacentes. Apenas no 14<sup>o</sup> dia de gestação, os vasos sanguíneos são formados, o que permite que as células progenitoras hematopoiéticas entrem no primórdio tímico via corrente sanguínea (BARTHLOTT, *et al.*, 2006). Posteriormente, os tecidos tímicos perdem sua conexão com a faringe e migram para sua localização definitiva, onde se fundem para formar um único órgão bilobado (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

O timo está situado no mediastino ântero-superior na altura dos grandes vasos do coração (SONE *et al.*, 1980), é constituído de dois lobos encapsulados que são parcialmente subdivididos em múltiplos lóbulos, por septos fibrosos. Morfologicamente, cada lóbulo é dividido em região cortical e



medular, separadas pela junção cortico-medular (OHL *et al.*, 2003). A região cortical abriga as células pré-T nos estágios mais precoces de maturação, sendo intensamente corada por possuir uma grande densidade linfocitária. Já a região medular, localizada na porção mais interna no lóbulo, é o local onde as células T encontram-se em menor número, porém nos estágios finais de maturação, capazes de sair desse órgão como linfócitos T imunocompetentes e povoar regiões específicas nos órgãos linfóides periféricos (PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; SAVINO & DARDENE, 2010).

Ainda que o timo seja um órgão linfóide primário, capaz de gerar célula T madura, funcional e auto-tolerante durante toda a vida adulta, esse órgão não possui células auto-renováveis, o que torna a produção de células T imunocompetentes, um processo dependente do recrutamento contínuo de precursores linfóides derivados da medula óssea (CIOFANI & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

A arquitetura tímica, com diferentes microambientes, é essencial para a maturação e diferenciação de timócitos, uma vez que as subpopulações localizam-se em nichos distintos no órgão, recebendo sinais diferenciados em cada região (PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

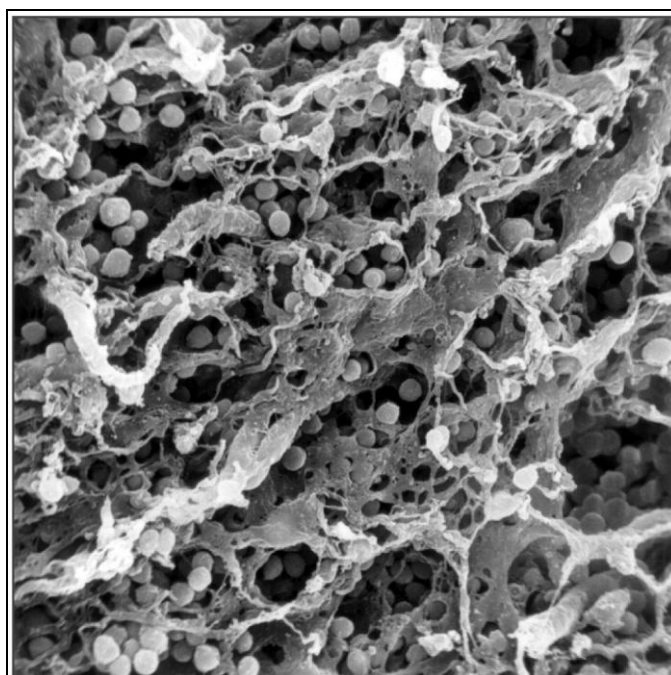
### **3.2.1 Microambiente tímico**

No timo ocorrem os eventos celulares responsáveis pela diferenciação das células T. Este processo é dinâmico, ordenado e compartimentalizado em diferentes regiões do microambiente que, devido a sua composição específica, fornece sinais essenciais para o direcionamento das células em desenvolvimento (PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

O microambiente tímico é formado por uma rede tridimensional composta por tipos celulares distintos, por timócitos em diferentes estágios de desenvolvimento e por componentes moleculares. Os constituintes não

linfóides, como as células epiteliais tímicas (TEC), células dendríticas, macrófagos, fibroblastos e também os componentes moleculares, como quimiocinas, citocinas, hormônios e moléculas da matriz extracelular (MEC) constituem o estroma tímico. Essa microarquitetura especializada abriga, estimula e direciona os timócitos, distribuindo-os diferencialmente pelos compartimentos tímicos (Figura 1) (ANDERSON & JENKINSON, 2001).

Os principais componentes não linfóides do timo são as células epiteliais tímicas (TEC), que se organizam numa rede interconectada de modo a percorrer todo o órgão. No entanto, este epitélio é heterogêneo, pois, as TEC das regiões cortical e medular apresentam características morfológicas e fenotípicas distintas (DE SOUZA *et al.*, 1993).



**Figura 1. Microambiente tímico.** Micrografia eletrônica de varredura do timo, onde se pode observar timócitos em desenvolvimento (células esféricas) ocupando os interstícios de uma extensa rede de células e matriz extracelular do microambiente tímico. Fonte: JANEWAY *et al.*, 2007.

Na região cortical tímica, encontram-se complexos linfoepiteliais multicelulares denominados TNC (Thymic Nurse Cell), formados por TEC envolvendo de 2 a 200 timócitos em diferentes estágios de diferenciação (PEZZANO *et al.*, 2001). As TNCs fornecem um ambiente propício para

sobrevivência, proliferação e diferenciação intratímica dos timócitos, pois são capazes de secretar hormônios tímicos, como a timulina, e moléculas da MEC, além de expressarem na superfície celular, moléculas que participam da maturação dos timócitos, como o MHC de classe I e classe II (VILLA-VERDE *et al.*, 1995).

As interações entre o epitélio tímico e os timócitos são fundamentais para a diferenciação dos linfócitos T. As TEC influenciam esse processo de modo pleiotrópico através da interação direta com os timócitos mediada por moléculas de adesão célula-célula e moléculas de MHC classe I e II. E ainda, através da secreção de citocinas que, dentre outros efeitos, podem aumentar a sobrevivência e estimular a proliferação, assim como quimiocinas, moléculas de MEC e metaloproteinases de matriz, que direcionam os timócitos para as diferentes regiões do microambiente de acordo com o estágio de maturação em que se encontram ao longo das diferentes etapas do processo de diferenciação (SAVINO *et al.*, 2004; JENKINSON *et al.*, 2008). A importância das TECs no processo de desenvolvimento dos timócitos pode ser evidenciada em estudos envolvendo camundongos *nude*, nos quais ocorre mutação no gene que codifica o fator de transcrição FoxN1, o que prejudica a diferenciação das TECs, levando ao completo bloqueio da timopoiese, causando imunodeficiência severa (SU *et al.*, 2003; BLEUL *et al.*, 2006).

Distribuindo-se pelas regiões do microambiente tímico também são encontradas células não epiteliais, como células fagocíticas e apresentadoras de antígenos. Os macrófagos residentes no córtex tímico realizam a fagocitose das células T apoptóticas (PAESSENS *et al.*, 2008). As células dendríticas (DC) encontram-se distribuídas na junção cortico-medular e na medula, possuem a capacidade de apresentar uma gama de peptídeos tecido-específicos às células T em desenvolvimento, através das moléculas do MHC de classe I e II, sendo responsáveis pelo fenômeno da seleção negativa (PROIETTO *et al.*, 2009).

Outro componente tímico, os fibroblastos, estão localizados principalmente em regiões ricas em tecido conjuntivo, como a cápsula e o

septo. São células essenciais na proliferação das TECs devido à produção dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGF) (SAVINO *et al.*, 2000; JENKINSON *et al.*, 2008).

As células do microambiente tímico também modulam a diferenciação dos timócitos através de polipeptídios solúveis, pois essas células secretam citocinas, quimiocinas e hormônios tímicos. Os timócitos, ainda podem ser influenciados pelo microambiente tímico via interação mediada pela MEC (SAVINO *et al.*, 2004).

### 3.2.2 Diferenciação e migração intratímica de células T

Os precursores de células T, derivados da medula óssea, chegam ao timo através das vênulas pós-capilares localizadas próximas a junção cortico-medular, onde encontram-se a maioria dos vasos sanguíneos capazes de suportar o extravasamento das células precursoras (ANDERSON & JENKINSON, 2001; GILL *et al.*, 2003). Este recrutamento envolve vários passos, incluindo a adesão inicial com baixa afinidade através das selectinas, a rolagem das células sobre o endotélio, a adesão de alta afinidade mediada por integrinas, e a transmigração através do endotélio (MADRI & GRAESSER, 2000). Acredita-se que a migração dos progenitores linfóides para o timo, aconteça em resposta a estímulos quimioatraentes liberados pelo estroma tímico (GILL *et al.*, 2003; JENKINSON *et al.*, 2008).

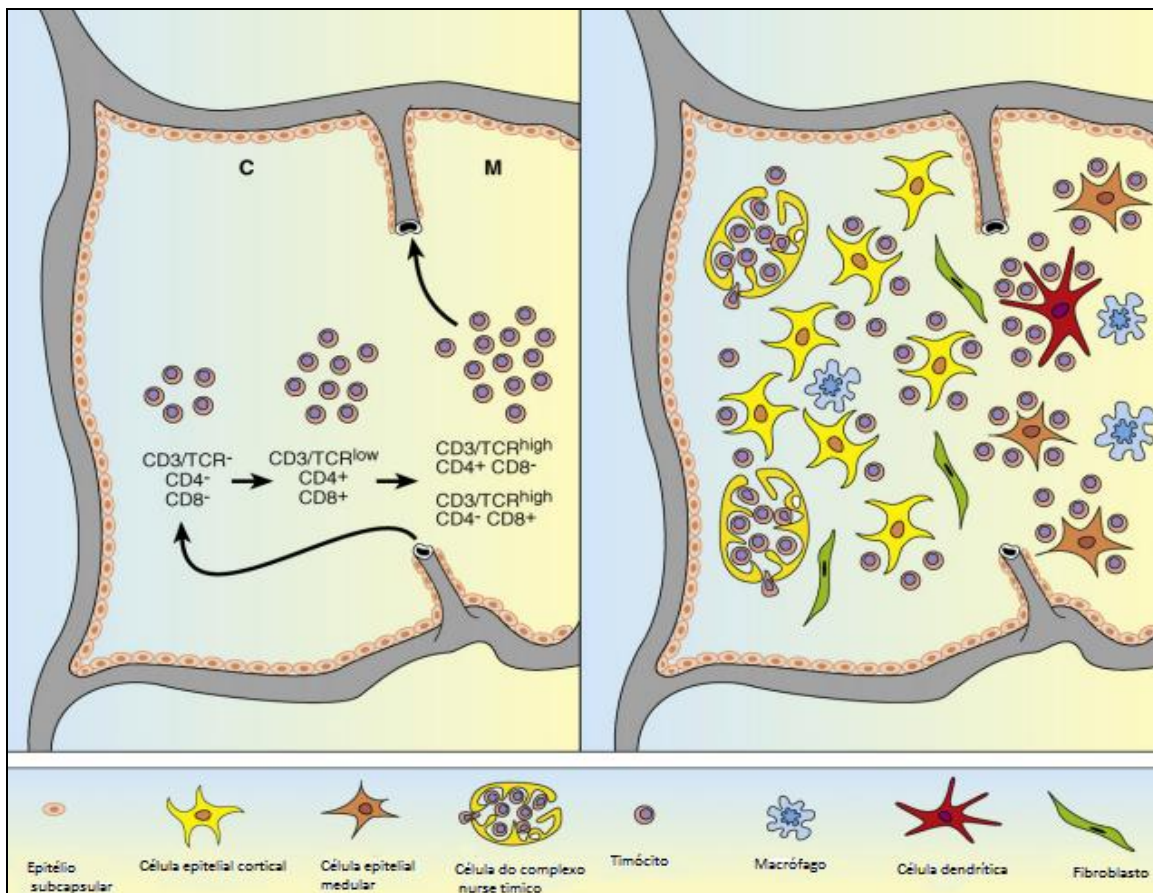
A diferenciação dos timócitos pode ser monitorada pela expressão de alguns marcadores de membrana, como o receptor de célula T (TCR) e as moléculas CD4 e CD8. Essa diferenciação é dependente dos sinais derivados do microambiente, tanto diretamente, na forma de contato célula:célula, como indiretamente, através de fatores solúveis (SAVINO & DARDENNE, 2010).

Os precursores de células T, quando entram no timo, não expressam o complexo TCR nem os co-receptores CD4 ou CD8 (TCR<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Estas

células são denominadas duplo-negativas (DN) e representam 3-5% do total de timócitos. Em camundongos, as células DN podem ainda ser subdividida em quatro sub-etapas de desenvolvimento, DN1, DN2, DN3 e DN4, baseadas, principalmente, na expressão de duas moléculas de superfície celular: o CD25 (IL-2R $\alpha$ ), cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-2, e o CD44 (Pgp-1), receptor para ácido hialurônico e fibronectina. Com o progresso da maturação, essas células migram da região subcapsular para o córtex, onde ocorre regulação positiva da molécula CD3 e o rearranjo gênico das cadeias que formam o TCR, onde passam então a expressar o TCR e as moléculas CD4 e CD8 (TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) sendo denominadas células duplo positivas, as quais constituem cerca de 75-85% da população de timócitos. As células que não são capazes de expressar um TCR funcional morrem por apoptose, enquanto as que o expressam são expostas aos peptídeos endógenos apresentados pelo MHC presentes nas células do microambiente tímico. Essas interações determinam a seleção positiva e negativa, evento decisivo para a seleção do repertório de célula T madura (CIOFANI & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; PETRIE & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; GAMEIRO *et al.*, 2010).

Na seleção positiva, os timócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> interagem fracamente com as moléculas do MHC presentes no epitélio cortical e este evento direciona as células a perder um dos co-receptores CD4 ou CD8 e a migrarem para região medular, dando origem aos timócitos simples positivo (TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou TCR<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), compreendendo cerca de 10 % e 5 % dos timócitos, respectivamente. Em seguida, os timócitos simples positivos sofrem seleção negativa, e aqueles que possuem TCR que se liga fortemente aos peptídeos próprios, presentes no microambiente tímico, são eliminados. As células que não sofrem rearranjo produtivo do TCR, assim como aquelas que foram selecionadas negativamente após interação TCR-MHC, morrem por apoptose. De fato, apenas 3-5% dos timócitos gerados serão exportados para a periferia do sistema imune, onde irão formar a grande maioria do repertório de células T (Figura 2) (GRAHAM *et al.*, 2000; ANDERSON & JENKINSON, 2001; CIOFANI & ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007).

Vale ressaltar, que essa migração direcionada dos timócitos rumo a sua diferenciação necessita de eventos seqüenciais de adesão e de-adesão da célula migrante sobre um substrato biológico, fornecido pelas moléculas de MEC, organizadas de formas distintas no córtex e na medula (SAVINO *et al.*, 2004).



**Figura 2. Diferenciação intratímica de células T e microambiente tímico.** O painel da esquerda esquematiza a migração dos timócitos, mostrando a entrada de precursores de células T através de vasos sanguíneos localizados na junção cortico-medular. Após entrarem no timo, durante o processo de diferenciação, os timócitos migram para o córtex e, posteriormente, para a medula. O painel a direita mostra um lóbulo tímico onde estão ilustrados os vários componentes celulares do microambiente tímico que interagem com os timócitos. Modificado de SAVINO & DARDENNE, 2010.

### 3.2.3 Matriz extracelular tímica e integrinas

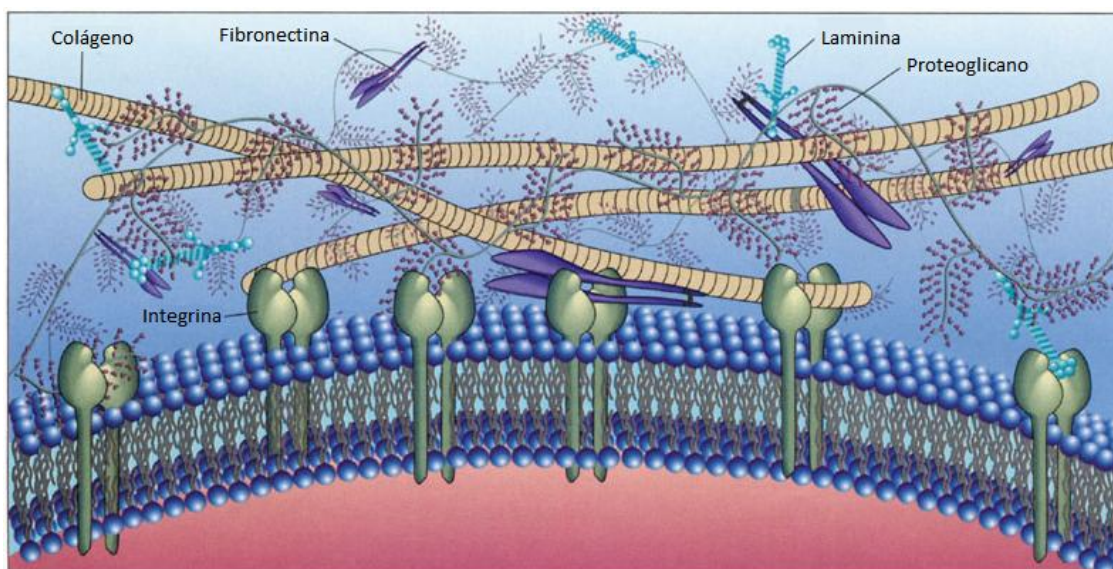
A matriz extracelular (MEC) é uma rede acelular formada por proteínas e polissacarídeos, (Figura 3) que além de interagir entre si formando um arcabouço físico para a sustentação do tecido, ainda está em contínua interação com as células ao seu redor, modulando eventos de proliferação, adesão, migração e sobrevivência dessas células (VAKONAKIS & CAMPBELL, 2007). No timo, os principais componentes da MEC são as glicoproteínas, fibronectina e laminina, e colágenos tipo I, III e IV (MEIRELES DE SOUZA *et al.*, 1993; SAVINO *et al.*, 2004).

A fibronectina é uma glicoproteína de adesão celular, que pode ser sintetizada por fibroblastos e células epiteliais, apresenta-se como uma estrutura heterodimérica e está envolvida em vários processos biológicos como embriogênese, crescimento, proliferação, migração, além da adesão celular (INGHAM, 2004).

Duas isoformas de fibronectina são encontradas no timo, sendo reconhecidas por receptores diferentes. A isoforma que está distribuída por todo o microambiente tímico se liga ao VLA-5 (CD49e - receptor clássico da fibronectina) através da sequência RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), e a isoforma com distribuição aparentemente restrita à medula, é reconhecida pelo receptor VLA-4 (CD49d), formada através de um *splicing* alternativo do mRNA de fibronectina através da sequência de ácido aspártico-arginina-glutamina-valina (SAVINO *et al.*, 2004).

Outro importante componente da matriz extracelular é a laminina, uma glicoproteína de adesão celular que, estruturalmente se apresenta como um heterotrímero de conformação cruciforme, formada por três cadeias peptídicas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Atualmente, existem pelo menos 16 isoformas de laminina que exibem expressão diferencial nos tecidos (ARENAS & ZURBARÁN, 2002; OCAMPO, 2008).

No timo, a laminina é secretada pelas células epiteliais e encontra-se distribuída por todo estroma. Em 2008 Ocampo e colaboradores, demonstraram que a laminina-211 controla a entrada e a saída dos timócitos no interior do complexo linfopitelial TNC e que a presença de laminina fornece um microambiente propício para a proliferação e diferenciação dos timócitos. A interação de diferentes isoformas de laminina com seus receptores correspondentes, presentes na superfície dos timócitos é relevante para os eventos de adesão, migração e sobrevivência dessas células (KIM *et al.*, 2000).



**Figura 3. Organização da matriz extracelular (MEC).** A MEC é formada por várias proteínas e polissacarídeos, organizados de maneira a formar uma rede complexa, fundamental para a manutenção tecidual e a interação célula-célula e célula-MEC. Extraído e modificado de [http://219.221.200.61/ywww/zbsw\(E\)/edetail4.htm](http://219.221.200.61/ywww/zbsw(E)/edetail4.htm).

Um evento essencial para vários processos biológicos é a interação célula-MEC, viabilizada por receptores específicos de superfície celular denominado integrinas (VACCA *et al.*, 2001; TIMOTHY *et al.*, 2004). Estas moléculas foram assim chamadas por integrarem os compartimentos intra e extracelular, possuem um domínio citoplasmático capaz de se ligar a



elementos do citoesqueleto e um domínio extracelular de interação com as moléculas presentes no microambiente, como as proteínas da MEC ou outras células. Assim, são consideradas receptores de sinalização bidirecional visto que, transmitem informação tanto dentro como fora da célula (HYNES, 2006; IMAI *et al.*, 2010).

As integrinas pertencem a uma família de glicoproteínas que formam receptores heterodiméricos constituídos de uma subunidade  $\alpha$  e outra  $\beta$ . Até o momento, foram descritas dezoito subunidades  $\alpha$  e oito  $\beta$ , formando pelo menos vinte e quatro integrinas diferentes, constituindo a família mais diversa de moléculas de adesão celular (TIMOTHY *et al.*, 2004).

Os timócitos expressam, principalmente, as integrinas denominadas VLAs (*very late antigens*) da família  $\beta 1$ , como por exemplo, os receptores VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$  ou CD49e) para fibronectina, e o receptor VLA-6 ( $\alpha 6\beta 1$  ou CD49f) para laminina. No entanto, a distribuição destas moléculas é modificada segundo o estágio de maturação, refletindo uma influência diferencial dos ligantes e receptores em cada etapa do desenvolvimento (SAVINO *et al.*, 2000, 2004).

A migração intratímica de timócitos, durante o processo de diferenciação, é um sistema complexo e de natureza multivetorial em que cada vetor representa uma dada interação ligante/receptor (SAVINO, 2007). O microambiente tímico é formado por uma rede tridimensional de glicoproteínas que compõem a MEC. Estas glicoproteínas formam um complexo macromolecular que contribui como pontos de ancoragem para as células estromais e timócitos, sendo importantes moléculas sinalizadoras intervenientes no desenvolvimento dos timócitos através de sua participação nos eventos de diferenciação, migração, proliferação e ativação celular (SAVINO *et al.*, 2004). Além disso, diferentes fatores de crescimento, quimiocinas e hormônios estão associados com a MEC, representando um importante fator na regulação da resposta imune celular (SAVINO *et al.*, 2004; SMANIOTTO *et al.*, 2005; MENDES-DA-CRUZ *et al.*, 2008).

No entanto, apesar da importância dessas interações na fisiologia do órgão, a ação de produtos naturais sobre as mesmas no microambiente tímico

ainda é pouco conhecida. Nesse contexto, as plantas medicinais poderão ser mais um dos fatores capazes de modular os eventos relacionados à migração durante a diferenciação dos timócitos.

### 3.3 O Uso de plantas medicinais

As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado à saúde constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Elas aparecem como parte do cuidado à saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertado o interesse de vários pesquisadores. O crescente interesse da comunidade científica pela fitoterapia nas duas últimas décadas levou ao desenvolvimento de várias pesquisas baseadas em práticas populares (SANTOS & AMORIM, 2002; GUERRA *et al.*, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 65-80% da população do planeta, de algum modo, utilizam plantas medicinais como medicamentos e que 25 mil espécies de plantas sejam usadas nas preparações medicinais. Essa mesma organização tem divulgado a importância do uso de plantas medicinais como recurso terapêutico viável, uma vez que cerca de 25% dos fármacos atualmente disponíveis no mercado são direta ou indiretamente derivados de plantas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Atualmente, as atividades farmacológicas e em particular a ação imunobiológica das plantas, tem sido o foco da medicina alternativa. Alguns constituintes isolados como os polissacarídeos, lecitinas (HAIJTO *et al.*, 1989), proteínas e peptídeos (KUTTAN & KUTTAN, 1992) foram encontrados, interferindo nas diferentes funções do sistema imunológico, incluindo a ativação da imunidade mediada por células (ELHABAZI *et al.*, 2006).

Algumas plantas são apontadas como potentes imunomoduladores (SINGH & ATAL, 1986; THATTE, 1996), a exemplo do que foi demonstrado

com o extrato etanólico de *Plumbago rosea* que apresenta efeitos supressivos sobre peso do timo (SOLOMON et al., 1993). Em contraste, o extrato aquoso de *Trigonella foenum* aumenta o peso do timo e o número de timócitos (BIN-HAFEEZ et al., 2003). Ainda, o extrato de *Epimedium alpinum* produz um efeito estimulatório na proliferação de timócitos e produção de IL-2 (KOVACEVIĆ et al., 2006).

Os problemas de saúde ocasionados pelo uso incorreto de plantas medicinais, muitas vezes ocorridos de forma indiscriminada e sem nenhuma base científica, levaram a OMS a adotar algumas estratégias para regulamentação dos medicamentos de uso popular tornando-os mais seguros e acessíveis a população. Uma destas estratégias é a disponibilização de um guia de informações para o uso apropriado da medicina alternativa, fornecendo as informações necessárias para o uso correto e seguro das plantas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; GUERRA et al., 2006).

Assim, torna-se necessária e de grande importância a pesquisa científica para a comprovação das atividades farmacológicas e toxicológicas das plantas medicinais utilizadas popularmente. Nesse contexto, o Brasil, com sua enorme biodiversidade, apresenta-se com um grande potencial para pesquisa e exploração na área de plantas medicinais, podendo contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos (ALVES et al., 2000). Dentre esta imensa variedade de espécies vegetais encontram-se as plantas da Família Fabaceae conhecida popularmente pela diversidade de aplicações e importância econômica.

### **3.3.1 Considerações sobre a Família Fabaceae, o gênero *Bowdichia* e a espécie *Bowdichia virgilioides***

A Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas com cerca de 750 gêneros e mais de 18.000 espécies, distribuídas em diferentes tipos de habitats, incluindo as áreas tropicais, subtropicais e temperadas (WINK, 2003).

É considerada a segunda maior família de plantas medicinais, contendo mais de 490 espécies utilizadas para fins terapêuticos, como a *Glycyrrhiza uralensis* que apresenta efeito inibitório na replicação *in vitro* do HIV e nos níveis de anticorpos na hepatite auto-imune, a *Trigonella foenum* capaz de reduzir significativamente os níveis de glicose no sangue e a *Erythrina falcata* utilizada como sedativo e ansiolítico (ALMEIDA, 2010; GAO *et al.*, 2010).

Foram reconhecidas três subfamílias dentro da família Fabaceae, sendo elas Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae. A subfamília Caesalpinioideae, compreende 170 gêneros e cerca de 3.000 espécies, é típica na flora amazônica e escassa no nordeste brasileiro. A Mimosoideae é bastante rica em espécies no nordeste brasileiro, compreendendo 65 gêneros e cerca de 3.000 espécies. A Faboideae é a maior das três subfamílias, com 455 gêneros e cerca de 12.000 espécies. Alguns gêneros são característicos da flora Amazônica e outros do Nordeste brasileiro (TUCKER, 2003; VEITCH, 2007).

Plantas do gênero *Bowdichia* pertencentes à subfamília Faboideae, possuem 19 espécies, porém, apenas duas tiveram seus constituintes químicos e suas propriedades farmacológicas investigadas cientificamente, a *Bowdichia nitida* e *Bowdichia virgilioides*. Estudos fitoquímicos recentes apontaram a presença de alcalóides, triterpenos e isoflavonóides em plantas pertencentes a esse gênero (MATSUNO *et al.*, 2008; MATSUNO *et al.*, 2009; THOMAZZI *et al.*, 2010).

A *Bowdichia nitida* é usada para o tratamento de reumatismo, febre e gota. Experimentos *in vitro* realizados com um isolado dessa espécie apresentaram citotoxicidade contra células tumorais, além de atividade contra *Plasmodium falciparum* (MATSUNO *et al.*, 2009).

*Bowdichia virgilioides* Kunth é uma árvore de tamanho médio, nativa das florestas tropicais da América do Sul, distribuindo-se desde a Venezuela até o Nordeste do Brasil (Figura 4). No Brasil é conhecida popularmente como sucupira, sucupira-preta e sucupira-açú (JUCK *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009; THOMAZZI *et al.*, 2010).

Suas sementes e cascas são amplamente empregadas na medicina popular, na forma de infusão, para o tratamento de diarreia, gota, diabetes, bronquite, hipertermia, inflamação, reumatismo, artrite, doenças auto-imunes e na cicatrização de feridas. A importância desta planta promoveu sua inclusão na primeira Farmacopéia Brasileira (VELOZO *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2006; BARROS *et al.*, 2010).

Estudos fitoquímicos realizados com essa espécie revelaram a presença de flavonóides, antocianina, benzofuranos, óleo essencial, triterpenóides, resinas e alcalóides (TORRENEGRA *et al.*, 1989; VELOZO *et al.*, 1999; MELO *et al.*, 2001). Algumas atividades biológicas relacionadas ao extrato bruto da *Bowdichia virgilioides*, foram comprovadas cientificamente nos últimos anos, entre elas: ação antimalárica, confirmada em estudos *in vitro* e *in vivo*, nos quais, o extrato etanólico se mostrou ativo contra cepas de *Plasmodium falciparum* e *P. berghei* (DEHARO *et al.*, 2001); atividade antiinflamatória, sugerida após redução da formação do edema induzido por carragenina e diminuição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em decorrência da administração do extrato aquoso em ratos *Wistar* (THOMAZZI *et al.*, 2010); além do efeito antinociceptivo, demonstrados na redução do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético após tratamento com extrato aquoso em camundongos *Swiss* (SILVA *et al.*, 2010).



**Figura 4: *Bowdichia virgilioides***

#### 4. Material e Métodos

---

#### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, adultos jovens, com idade média de 4 a 5 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por pelo menos 24 horas antes da realização dos experimentos. Todos os procedimentos foram aprovados e estão de acordo com as normas do Comitê de Ética Institucional da UFAL (Protocolo nº: 010095/2009-67).

#### 4.2 Material vegetal

Amostras de *Bowdichia virgilioides* foram coletadas no *Arboretum* da UFAL, Campus A. C. Simões no mês de março de 2008. A espécie foi taxonomicamente identificada pela Botânica Rosângela P. Lyra Lemos, sendo a exsicata da espécie depositada no Herbário do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA) sob nº. MAC29914.

#### 4.3 Preparo do extrato

A obtenção do extrato aquoso da casca do caule de *B. virgilioides*, denominado de EABv, seguiu o preparo utilizado na medicina popular. As cascas de *B. virgilioides* foram secas a temperatura ambiente e depois trituradas, o pó (30 gramas) foi colocado em um recipiente contendo 500 mL de água à temperatura de  $100^\circ\text{C}$ , que posteriormente foi fechado permanecendo em repouso para resfriar a temperatura ambiente por 6 h. A seguir, a solução foi filtrada e depois liofilizada.



#### 4.4 Tratamento *in vivo* com *B. virgilioides*

Os animais foram distribuídos randomicamente em grupos com 3-4 animais cada, aos quais foi administrados por via oral o EABv nas doses de 20 mg/kg ou 200 mg/kg de peso corpóreo, reconstituídos em 200 µL de solução salina (NaCl 0,9%), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (200 µL de sol. salina) utilizando a mesma via de administração. Todos os grupos receberam o tratamento uma vez ao dia e por sete dias consecutivos. Esses animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, 24 h após a administração da última dose. Durante o tratamento todos os animais foram pesados diariamente.

#### 4.5 Histologia convencional

Após a eutanásia, o timo dos animais foi retirado e fixado em líquido de Bouin por 48 horas, em seguida foi submetido a um processo de desidratação, em soluções crescentes de álcool etílico, permanecendo 72 horas em álcool 70%, 1 hora no álcool 90% para em seguida, ser colocado no álcool absoluto (100%) por 2 horas. A peça tímica foi, então, submetida a duas passagens de 1 hora em xilol P.A. Posteriormente, foram realizados dois banhos de parafina, de 2 horas, em estufa a 60°C, que depois foram emblocados. Uma vez em blocos de parafina, o material foi processado manualmente em micrótomo Leica 818, em cortes histológicos seriados com 6 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE). A análise foi realizada na seqüência dos cortes seriados para se determinar possíveis alterações no espessamento das regiões corticais e medulares.

#### 4.6 Peso e celularidade do timo

Para avaliar o efeito do extrato sobre o peso relativo do timo e o número de timócitos presentes no órgão, o timo dos animais dos grupos tratados e do grupo controle, foi removido, pesado e posteriormente macerado em placas de 24 poços contendo uma solução de PBS-SBF 4%, para a obtenção dos timócitos. Essas células em suspensão foram recolhidas e contadas em câmara de Neubauer ao microscópio de luz. Nessa contagem foram consideradas apenas as células viáveis, e para isso foi utilizada a técnica de exclusão pelo corante vital azul de tripan.

#### 4.7 Análise por citometria de fluxo

Foram realizadas análises por citometria de fluxo para determinar o fenótipo dos timócitos quanto à expressão das moléculas de superfície celular CD4/CD8 e quanto à expressão das integrinas VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$  ou CD49e) e VLA-6 ( $\alpha 6\beta 1$  ou CD49f) na superfície dessas células. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD4 marcados com APC (*Allophycocyanin*) e anti-CD8 acoplado a PerCP (*Peridin Chlorophylli Protein*) para identificar o fenótipo CD4/CD8 dos timócitos e anticorpos anti-CD49e (VLA-5) e anti-CD49f (VLA-6) marcados com PE (*Phycoerythrin*) para avaliar a expressão de receptores para moléculas da matriz extracelular, fibronectina e laminina, respectivamente. O controle negativo para análise foi feito com anticorpos primários de imunoglobulinas não relacionadas, que não geram marcação significativa.

Para tanto, os timócitos foram colocados em placas de 96 poços de fundo "U", em uma densidade de  $2 \times 10^6$  células/poço, após serem lavados com PBS e centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, as células foram incubadas com anticorpo específico, por 20 minutos, a 4°C, no escuro. Após a devida incubação, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas e posteriormente fixadas com formaldeído 2%. As leituras foram feitas em citômetro de fluxo

(FACSCanto II, BD) e os dados obtidos foram analisados através do software WinMDI versão 2.8.

#### **4.8 Ensaio de imunofluorescência**

Para avaliar o efeito do EABv na deposição da MEC, foi utilizado o ensaio de imunofluorescência em cortes congelados, onde o timo dos animais tratados ou do grupo controle, foi incluído em *tissue-tek* (polímero inerte), montado em um criomolde, e congelado a -80 °C. Posteriormente, o timo congelado foi submetido a cortes em criostato a -25 °C, onde finas secções (6 µm) foram obtidas e recolhidas em lâminas de vidro. As amostras foram fixadas com acetona e submetidas à técnica de imunofluorescência indireta, onde, as lâminas com os cortes foram pré-incubados por 30 minutos em solução de bloqueio para sítios inespecíficos (PBS contendo 1% de BSA e 20% de soro de camundongo). Terminado o bloqueio, os cortes foram incubados com os anticorpos primários específico para laminina ou fibronectina, adequadamente diluídos em PBS (1:50). As lâminas foram mantidas em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente, por 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e incubados durante 45 minutos com anticorpo secundário GAR-FITC, diluídos em PBS na concentração de 1:200. Posteriormente, os cortes foram novamente lavados com PBS e as lâminas montadas em glicerol e PBS (1:10). Depois de cobertas com lamínula, as lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon eclipse 50i).

#### **4.9 Ensaio de adesão**

Para investigar possíveis alterações nos padrões de adesão de timócitos frente à laminina e fibronectina, os timócitos de todos os grupos experimentais foram submetidos a ensaios de adesão realizados em frascos de 25 cm<sup>2</sup>.

Os frascos foram previamente incubados com 10 µg/ml de BSA, fibronectina ou laminina por 1 hora à temperatura ambiente, seguido de bloqueio com PBS/BSA 0,1% por 1 hora a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após bloqueio, os timócitos foram adicionados com meio de cultura RPMI na concentração de 1 x 10<sup>7</sup> células por frasco e foram mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora para adesão. Posteriormente, os frascos foram lavados delicadamente para remoção dos timócitos não aderidos, e em seguida, através de deslocamento mecânico, os timócitos aderidos foram recolhidos, quantificados e submetidos à marcação para análise por citometria de fluxo para determinar o fenótipo destas células.

#### 4.10 Ensaio de migração

Para analisar o efeito do EABv na migração de timócitos, foram realizados ensaios utilizando o sistema de *transwell* (Corning Costar, Cambridge, USA) empregando insertos com membranas de policarbonato com 6,5 mm de diâmetro e poros de 5 µm. Os insertos tiveram suas membranas previamente tratadas com moléculas de matriz extracelular, laminina ou fibronectina na concentração de 10 µg/mL, por 1 hora a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, ou BSA na mesma concentração (usada como controle basal para migração). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBS-BSA 0,1% por 45 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o bloqueio, foi adicionado aos poços inferiores das câmaras meio de cultura (RPMI/BSA 1%). Os timócitos (2x10<sup>6</sup> em 100 µL de RPMI/BSA 1%) foram colocados na parte superior da câmara. Após 3 horas a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub>, as células migrantes depositadas na câmara inferior foram coletadas e contadas. A fim de determinar as subpopulações dos timócitos migrantes, essas células foram submetidas à análise citofluorimétrica.

Para análise comparativa da atividade migratória de cada subpopulação, foi calculado o percentual de input (% de input) para cada subpopulação de timócito, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{INPUT (\%)} = \frac{\text{Número absoluto da subpopulação migrante} - \text{Número absoluto da subpopulação antes de migrar}}{\text{Número absoluto da subpopulação antes de migrar}} \times 100$$

#### 4.11 Avaliação do efeito do EABv sobre parâmetros toxicológicos

A toxicidade do EABv foi avaliada através da observação matinal de alguns parâmetros, como: morte, agressividade, alteração na mobilidade e variação no peso. Outro parâmetro estudado foi a análise histológica do fígado desses animais, procedimento realizado conforme já descrito anteriormente para o timo na sessão 4.5 do Material e Métodos.

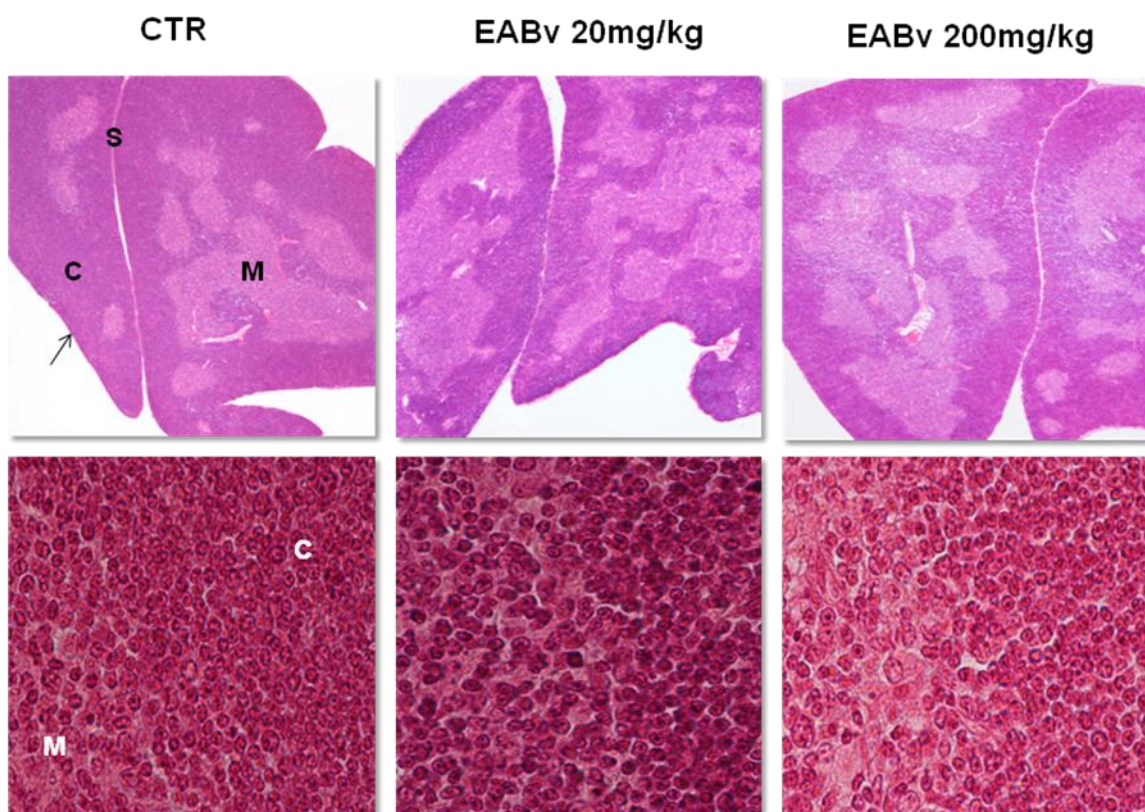
#### 4.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do teste de análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey ou teste Bonferroni, com o auxílio do software GraphPad Prism vs 5.0. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos analisados foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .



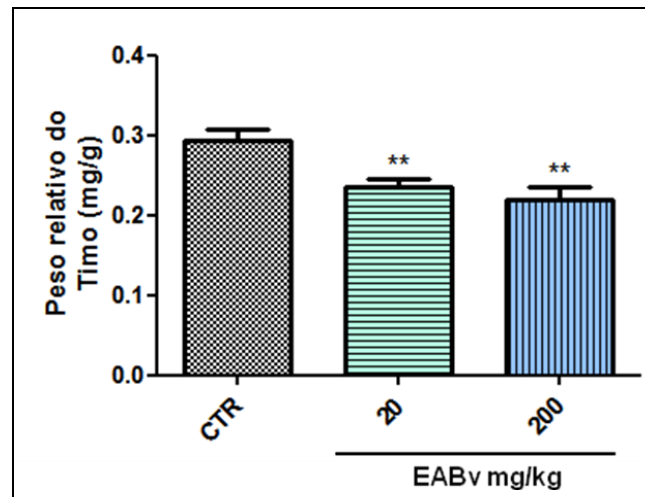
### 5.1 Efeito do tratamento com EABv na morfologia, peso relativo e celularidade do timo de camundongos

Inicialmente, para verificar a interferência do EABv sobre a morfologia do timo, analisou-se cortes seriados do órgão por microscopia de luz, e como pode ser observado na figura 5, a microarquitetura desse órgão permaneceu preservada quanto a presença da cápsula, septos e das regiões cortical e medular. No entanto, foi notada uma diminuição da região cortical, acompanhada de um maior espaçamento entre as células nos animais tratados com o extrato quando comparado aos animais tratados com solução salina (grupo controle).

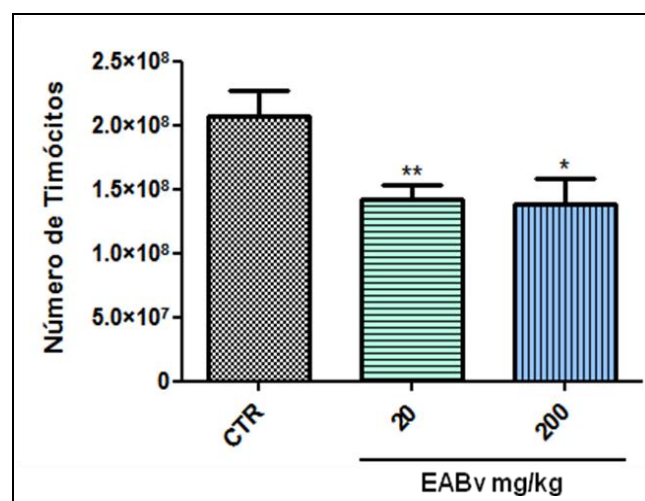


**Figura 5. Morfologia do timo.** Fotomicrografias de cortes parafinados do timo provenientes de animais tratados por via oral com solução salina (CTR) ou EABv nas doses de 20 ou 200 mg/kg por 7 dias. Coloração Hematoxilina-eosina. **M**= medula; **C**= córtex; **S**= septo; (→) = cápsula; Aumento de 40x (painel superior); Aumento de 1000x (painel inferior). Fotomicrografias representativas dos cortes seriados.

Ao avaliar o peso e a celularidade do timo desses animais, foi observada uma diminuição estatisticamente significativa tanto no peso no órgão como no número total de timócitos nos animais dos grupos tratados com o EABv quando comparado aos animais do grupo controle (figura 6 e 7).



**Figura 6. Efeito do EABv sobre o peso relativo do timo.** Os animais receberam por via oral salina (CTR) ou EABv nas doses de 20 ou 200 mg/kg por 7 dias. Os dados estão representados pela média  $\pm$  EPM (n=13). A análise estatística foi feita com o teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey. (\*) denota nível de significância comparado ao grupo tratado com solução salina. \*\*p<0,01.



**Figura 7. Efeito do EABv sobre o número de timócitos.** Os animais foram tratados por via oral com solução salina (CTR) ou EABv nas doses de 20 ou 200 mg/kg, por 7 dias. Os dados estão representados pela média  $\pm$  EPM (n=8). A análise estatística foi feita com o teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey. (\*) denota nível de significância comparado ao grupo tratado com salina. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

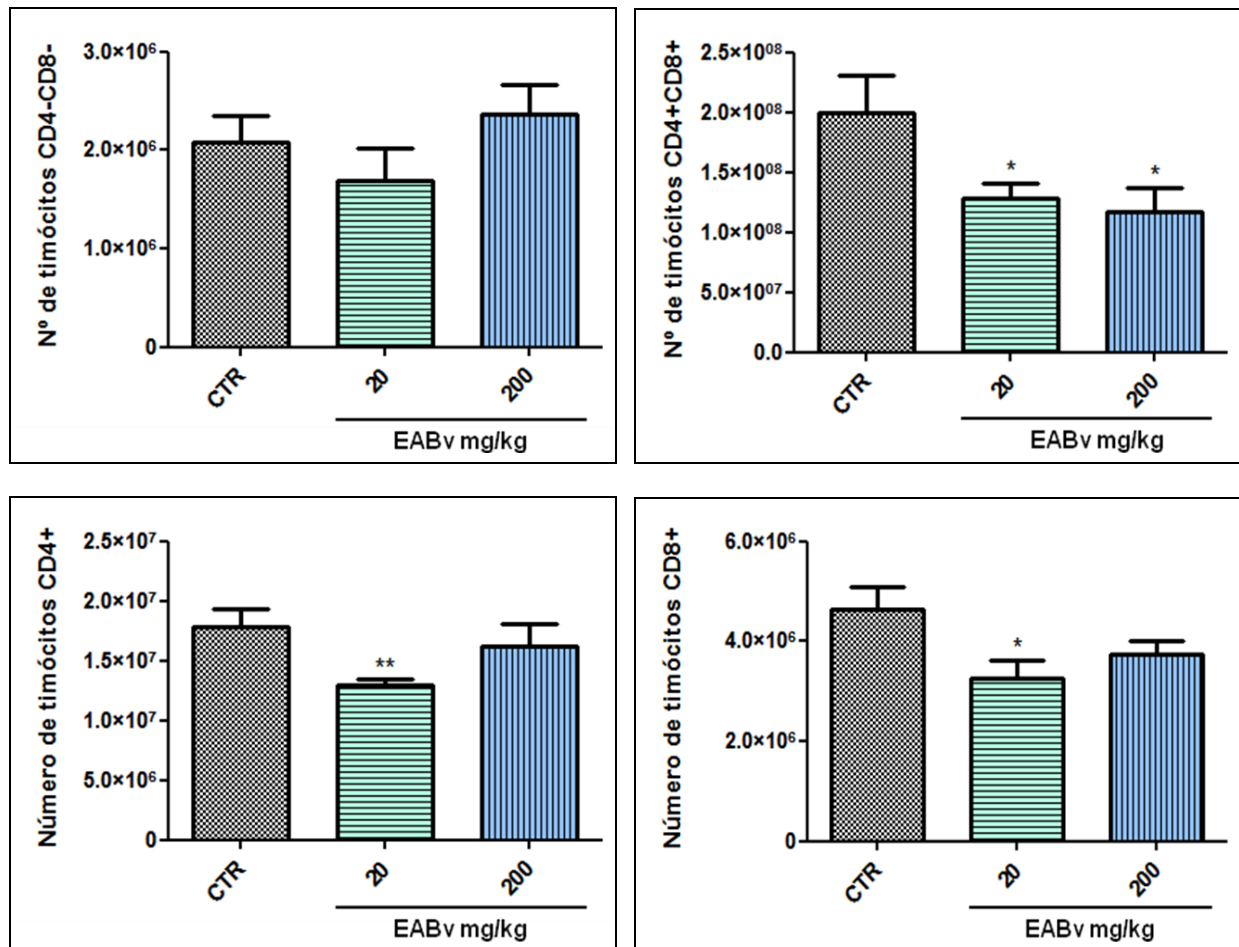


Considerando a modulação negativa do EABv sobre o número total de timócitos, procurou-se avaliar se esse extrato poderia interferir nas subpopulações dos timócitos imaturos: duplo negativos ( $CD4^-CD8^-$ ) e duplo positivos ( $CD4^+CD8^+$ ), ou maduros: CD4 simples positiva ( $CD4^+CD8^-$ ) e CD8 simples positiva ( $CD4^-CD8^+$ ), para isso foi realizada a análise citofluorimétrica com marcação para as moléculas de superfície celular CD4 e CD8.

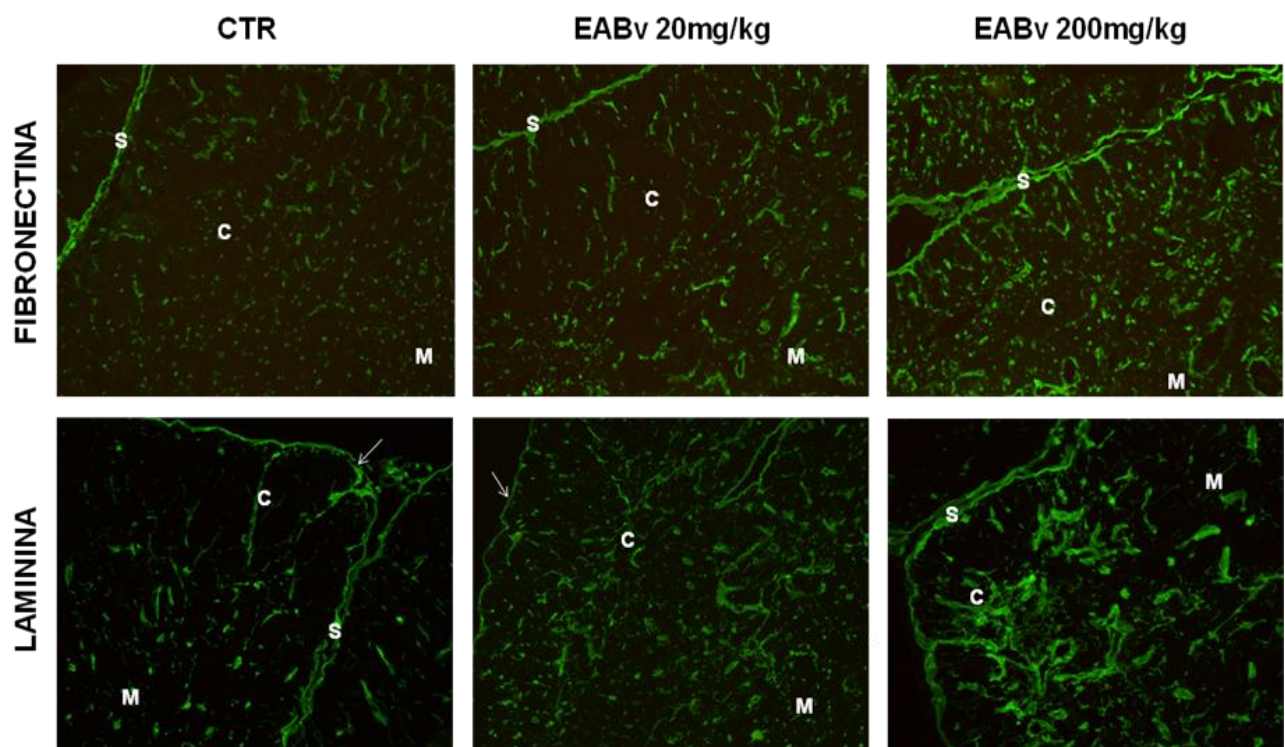
O EABv na dose de 20 mg/kg foi capaz de reduzir de forma estatisticamente significativa o número de timócitos  $CD4^+CD8^+$ ,  $CD4^+CD8^-$  e  $CD4^-CD8^+$ , quando comparado aos animais do grupo controle, já o EABv na dose de 200 mg/kg apenas interferiu no fenótipo duplo positivo, reduzindo de maneira estatisticamente significativa o número de timócitos  $CD4^+CD8^+$ , quando comparado ao grupo controle (Figura 8).

## **5.2 Efeito do EABv sobre ligantes e receptores de matriz extracelular no timo de camundongos**

Com o propósito de avaliar a influência do EABv na deposição de moléculas da matriz extracelular no microambiente tímico, utilizou-se o ensaio de imunofluorescência indireta em cortes congelados do timo com marcadores específicos para fibronectina e laminina. Como mostra a figura 9, o tratamento com o extrato na dose de 20 e 200 mg/kg, apresentou uma maior deposição de fibronectina e de laminina tanto na região cortical como na região medular, quando comparado com o grupo controle. O aumento na deposição dessas glicoproteínas de matriz extracelular ocorreu de maneira dose-dependente.



**Figura 8. Efeito do EABv sobre número de timócitos CD4/CD8.** As células foram obtidas de animais tratados, via oral, com solução salina (CTR) ou com o extrato nas doses de 20 ou 200 mg/kg, por 7 dias. Os dados estão representados pela média  $\pm$  EPM (n=8). A análise estatística foi feita com o teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey. (\*) denota nível de significância comparado ao grupo tratado com salina. \*p<0,05; \*\*p<0,01.



**Figura 9. Efeito do EABv na deposição de moléculas da matriz extracelular.** Fotomicrografias de cortes congelados do timo submetidos ao ensaio de imunofluorescência. Os animais foram tratados por via oral com solução salina (CTR) ou EABv nas doses de 20 ou 200 mg/kg, por 7 dias. ( → )= cápsula **M**= medula; **C**= córtex; **S**= septo; Aumento 100x.

Tendo em vista o efeito do EABv na produção das moléculas da matriz extracelular, fibronectina e laminina, no microambiente tímico, foi avaliado se o extrato poderia interferir na expressão das integrinas VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ ), receptor para fibronectina e VLA-6 ( $\alpha 6\beta 1$ ), receptor para laminina, na superfície dos tímócitos. Para isso, foi utilizada a análise por citometria de fluxo e como apresentado na figura 10, nenhum efeito estatisticamente significativo, do EABv, foi observado na expressão dessas integrinas.

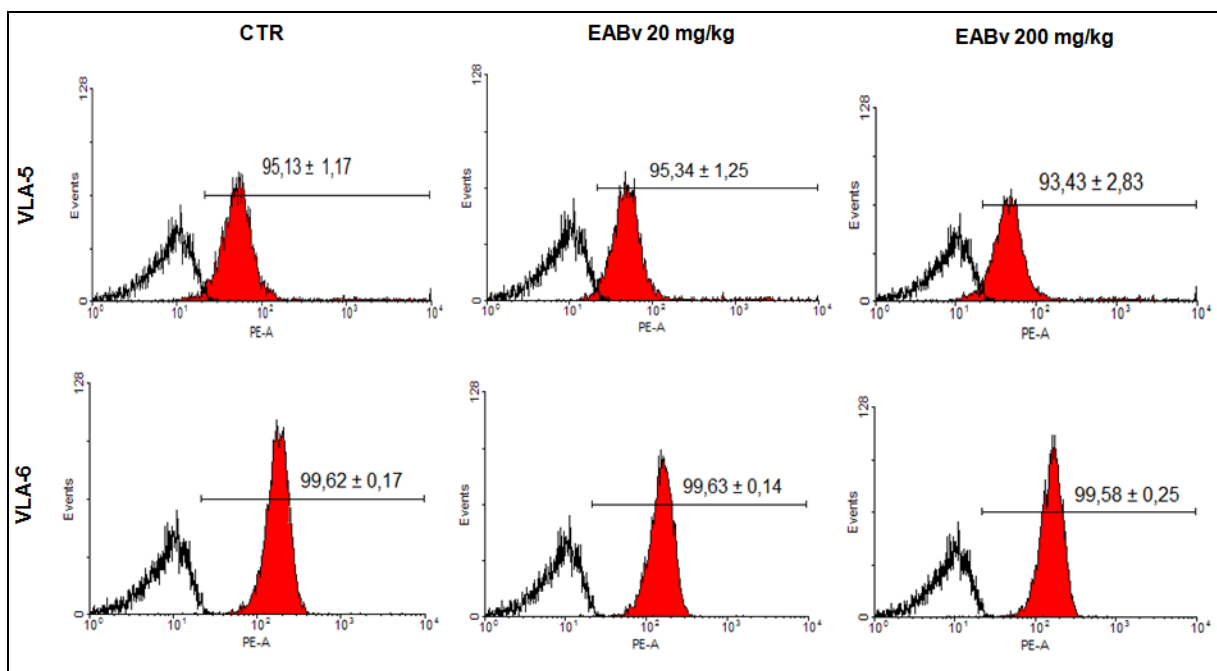
### 5.3 Efeito do EABv sobre adesão dos tímócitos

Com o propósito de avaliar possíveis modificações funcionais desencadeadas pelas alterações observadas no microambiente tímico dos animais tratados com EABv, foi realizado ensaios de adesão com tímócitos provenientes de animais dos diferentes grupos. Essas células foram cultivadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> previamente revestidas com fibronectina, laminina ou BSA e após uma hora de adesão, os tímócitos aderentes foram quantificados, seguindo o protocolo descrito na sessão 4.9 dos Materiais e Métodos.

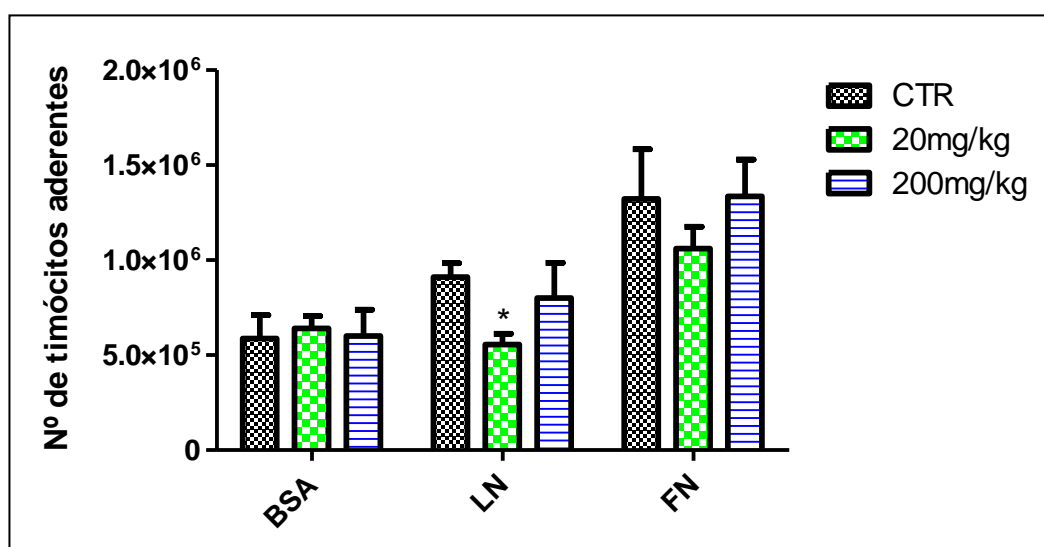
Apenas na dose de 20mg/kg, esse extrato foi capaz de induzir uma diminuição estatisticamente significativa no número total de tímócitos aderentes frente à laminina quando comparado ao grupo controle. No entanto, quando a adesão ocorreu frente à fibronectina não houve diferença significativa no número de tímócitos aderentes provenientes de animais tratados com o extrato em nenhuma das doses, quando comparado ao controle tratado com solução salina (Figura 11).

Considerando a modulação negativa do EABv sob o número total de tímócitos aderentes frente à laminina, buscou-se avaliar se esse extrato era capaz de alterar o fenótipo CD4/CD8 dos tímócitos após a adesão. Para isso, foram realizadas análises citofluorimétrica com marcação para as moléculas de superfície celular CD4 e CD8.

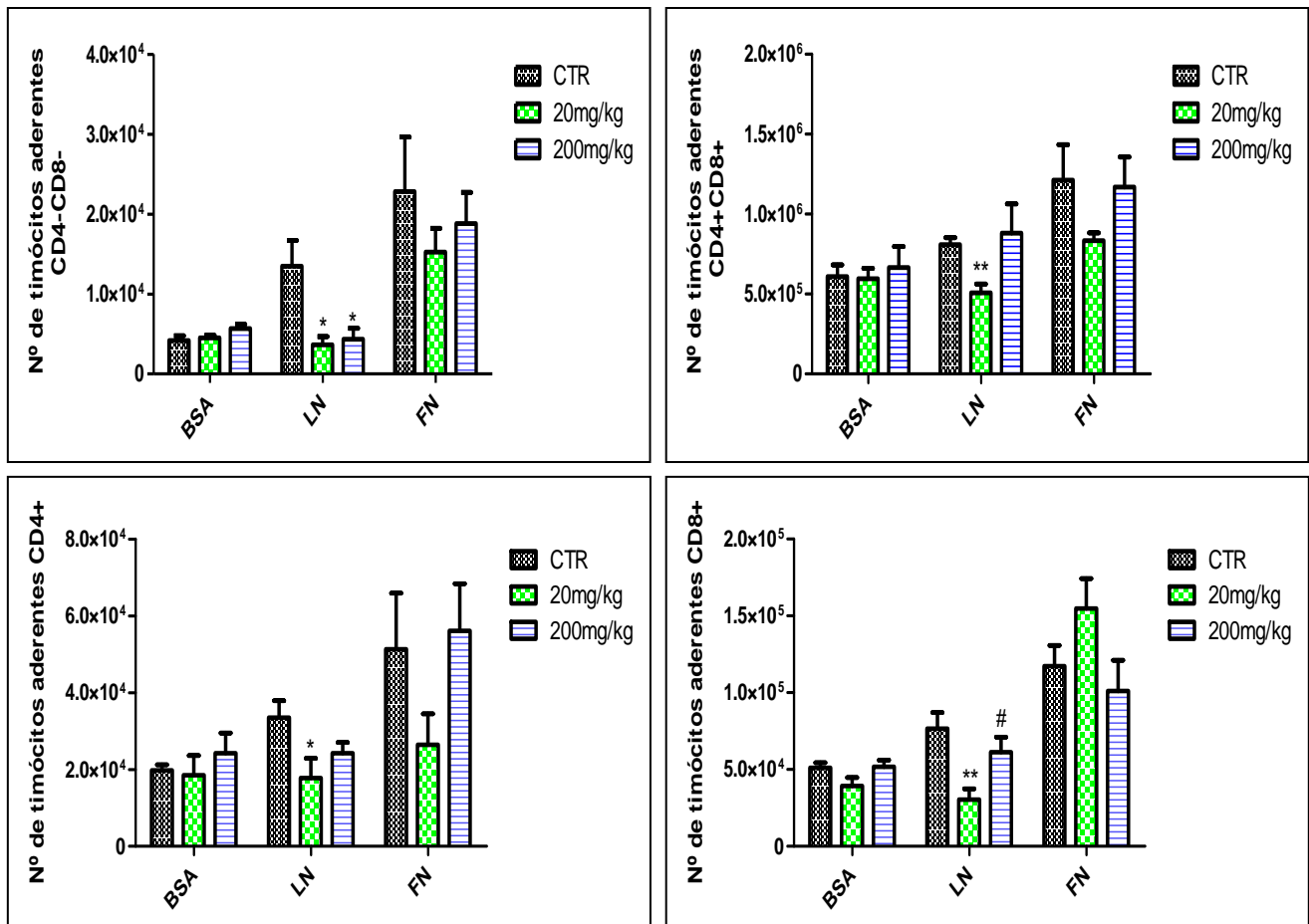
O EABv na dose de 20mg/kg foi capaz de reduzir a adesão frente à laminina, tanto dos timócitos imaturos  $CD4^-CD8^-$  e  $CD4^+CD8^+$  como dos timócitos maduros  $CD4^+CD8^-$  e  $CD4^-CD8^+$ . No entanto, na dose de 200 mg/kg esse extrato interferiu significativamente na subpopulação  $CD4^-CD8^-$ , reduzindo a adesão desses timócitos frente à laminina quando comparado ao grupo controle, ainda foi capaz de aumentar a adesão dos timócitos  $CD4^-CD8^+$  frente a laminina quando comparada ao grupo tratado com o extrato na dose de 20mg/kg (Figura 12).



**Figura 10. Efeito do EABv na expressão de integrinas na superfície dos timócitos.** Histogramas de citometria representando a expressão membranar da integrina VLA-5 (vermelho cheio) e da integrina VLA-6 (vermelho cheio) nos timócitos. O controle de marcação foi feito com imunoglobulina não-relacionada (preto vazado). As células foram obtidas de animais tratados, via oral, com solução salina (CTR) ou com o extrato nas doses de 20 ou 200 mg/kg, por 7 dias. Os dados estão representados pela média  $\pm$  EPM (n=10). A análise estatística foi feita com do teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de Tukey.



**Figura 11. Efeito do EABv sobre o número de timócitos aderentes.** As células foram obtidas de animais tratados, via oral, com solução salina (CTR) ou com o extrato nas doses de 20 ou 200 mg/kg, por 7 dias. Os dados estão representados pela média  $\pm$  EPM (n=6). A análise estatística foi feita com do teste *two-way* ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. (\*) denota nível de significância com relação ao grupo CTR correspondente. \* $p < 0,05$ .



**Figura 12. Efeito do EABv sobre fenótipo CD4/CD8 de timócitos aderentes.** As células foram obtidas de animais tratados, via oral, com solução salina (CTR) ou com o extrato nas doses de 20 ou 200 mg/kg, por 7 dias. Os dados estão representados pela média  $\pm$  EPM (n=6). A análise estatística foi feita com do teste *two-way* ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo CTR correspondente. # $p < 0,05$  em relação ao grupo LN 20mg/kg.

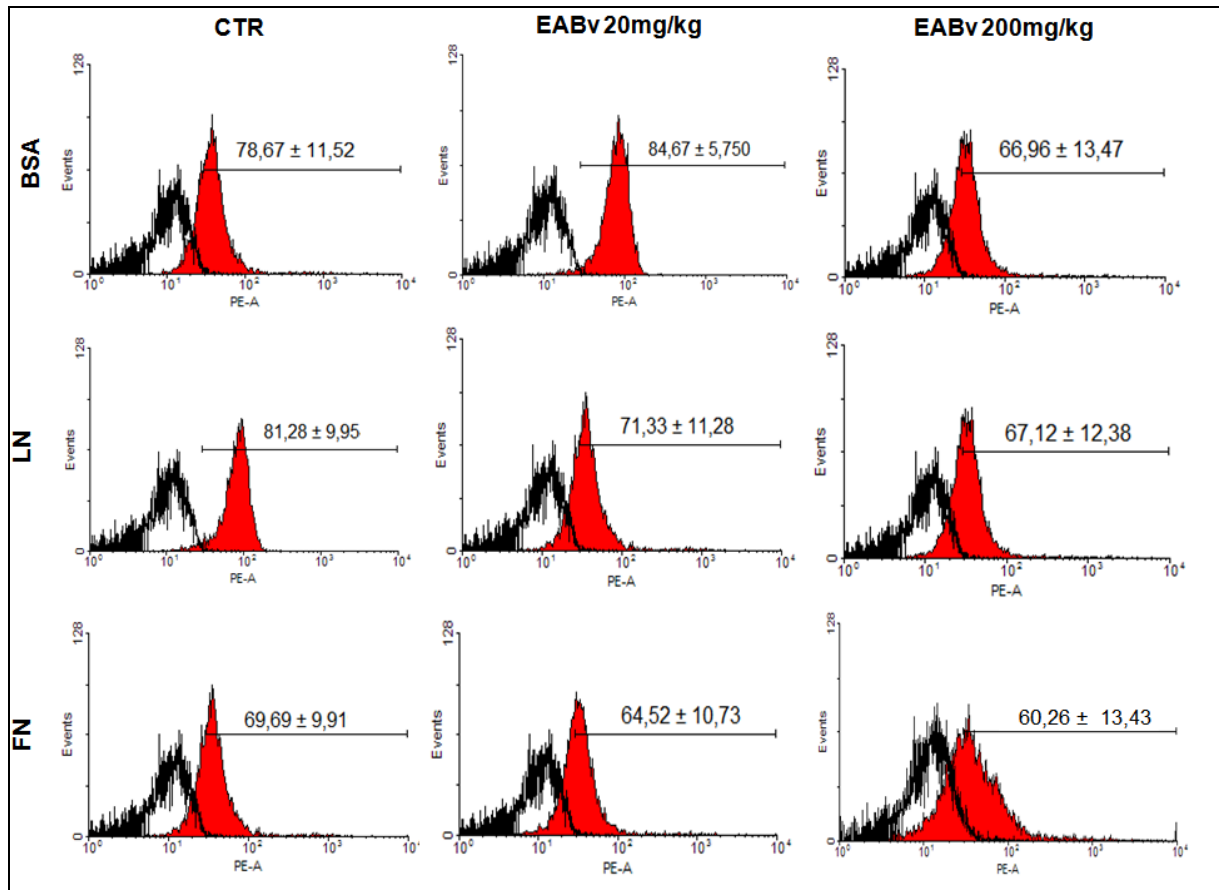
Tendo em vista os achados do efeito do EABv sobre a adesão de timócitos e sabendo que na superfície destas células encontram-se receptores que se ligam aos componentes da matriz extracelular, procurou-se determinar se o EABv poderia interferir na expressão dos receptores VLA-5 e VLA-6 na superfície dos timócitos aderentes. Foi utilizada a análise por citometria de fluxo e como pode ser observado nas figuras 13 e 14, o tratamento com EABv não foi capaz de alterar a expressão desses receptores na superfície dos timócitos após adesão frente à BSA, LN ou FN quando comparado ao grupo controle.

#### **5.4 Efeito do EABv sobre a migração de timócitos**

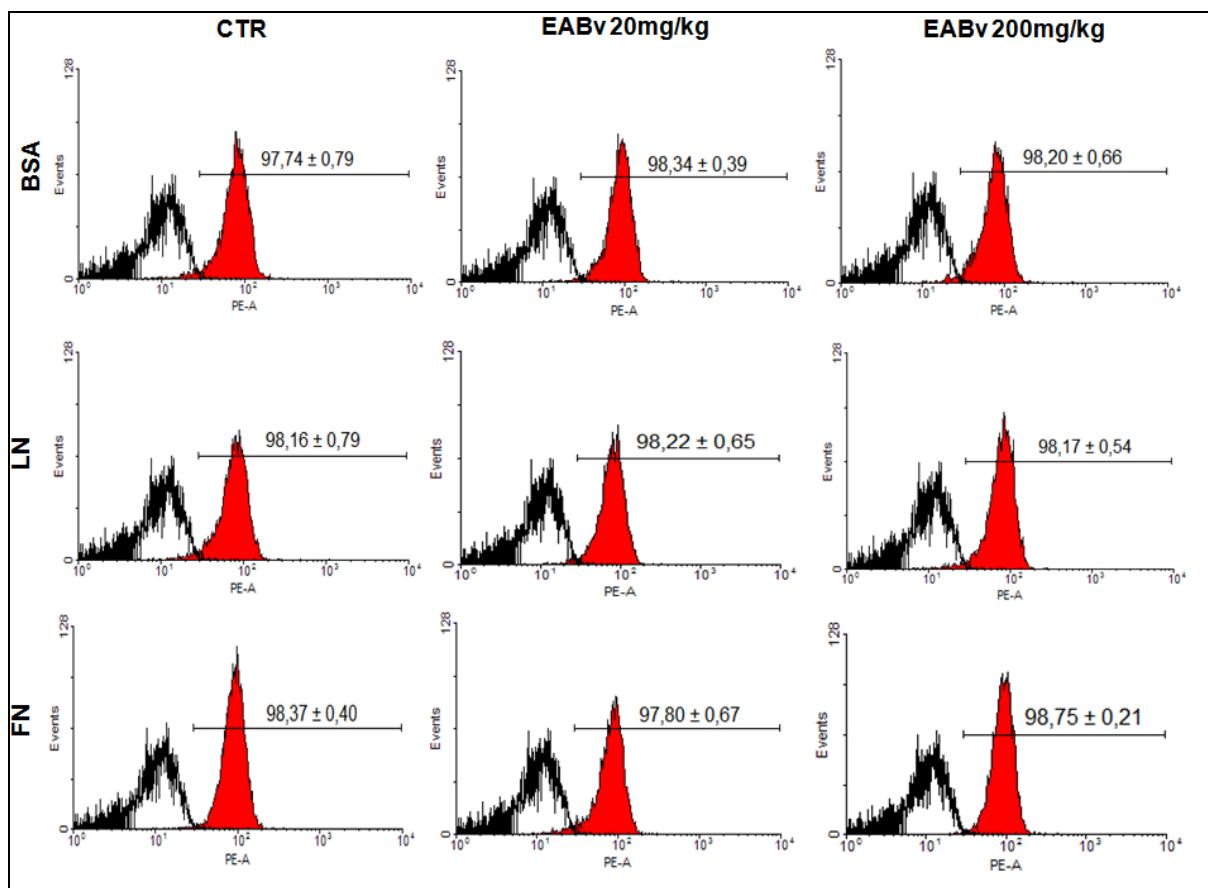
Buscando uma maior compreensão dos efeitos do EABv na fisiologia do timo, foram realizados ensaios de migração celular frente a fibronectina e a laminina. Para isso, foi utilizado o sistema de *transwell* onde as membranas dos insertos foram revestidos com fibronectina, laminina ou BSA (controle da migração), seguindo o protocolo descrito na sessão 4.10 dos Materiais e Métodos.

Como apresentado na figura 15, o tratamento com EABv na dose de 200 mg/kg, reduziu de maneira significativa o número total de timócitos migrantes frente à laminina quando comparado aos que receberam solução salina. No entanto, quando a migração ocorreu frente à fibronectina o EABv não foi capaz de interferir de maneira significativa no processo migratório.

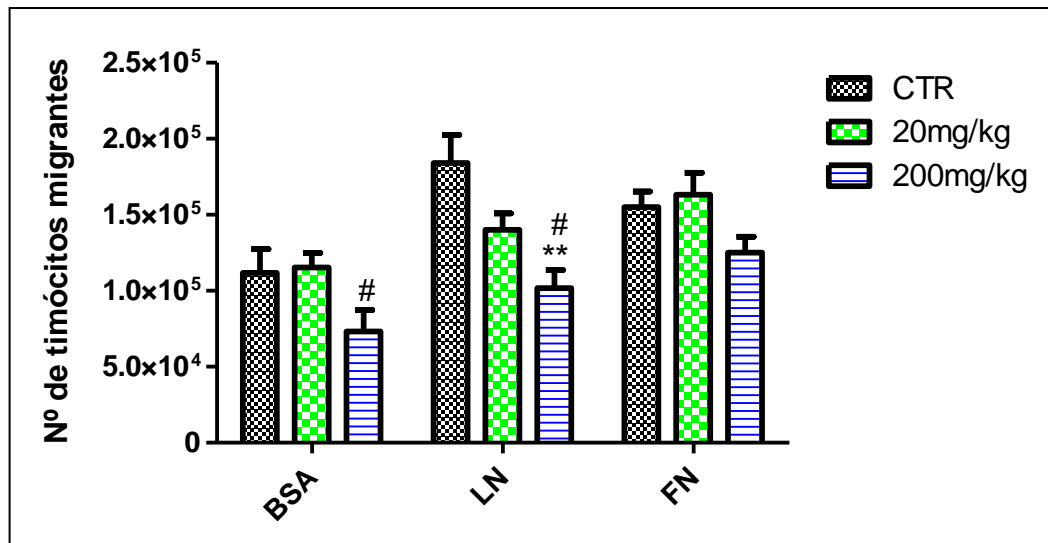




**Figura 13. Efeito do EABv sobre a expressão da integrina VLA-5 na superfície de tímócitos aderentes.** O painel mostra a detecção, por citometria de fluxo, do receptor para fibronectina, VLA-5, na superfície de tímócitos após adesão frente ao BSA, laminina ou fibronectina. O traço citofluorimétrico em preto representa a marcação obtida com imunoglobulina não relacionada. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.



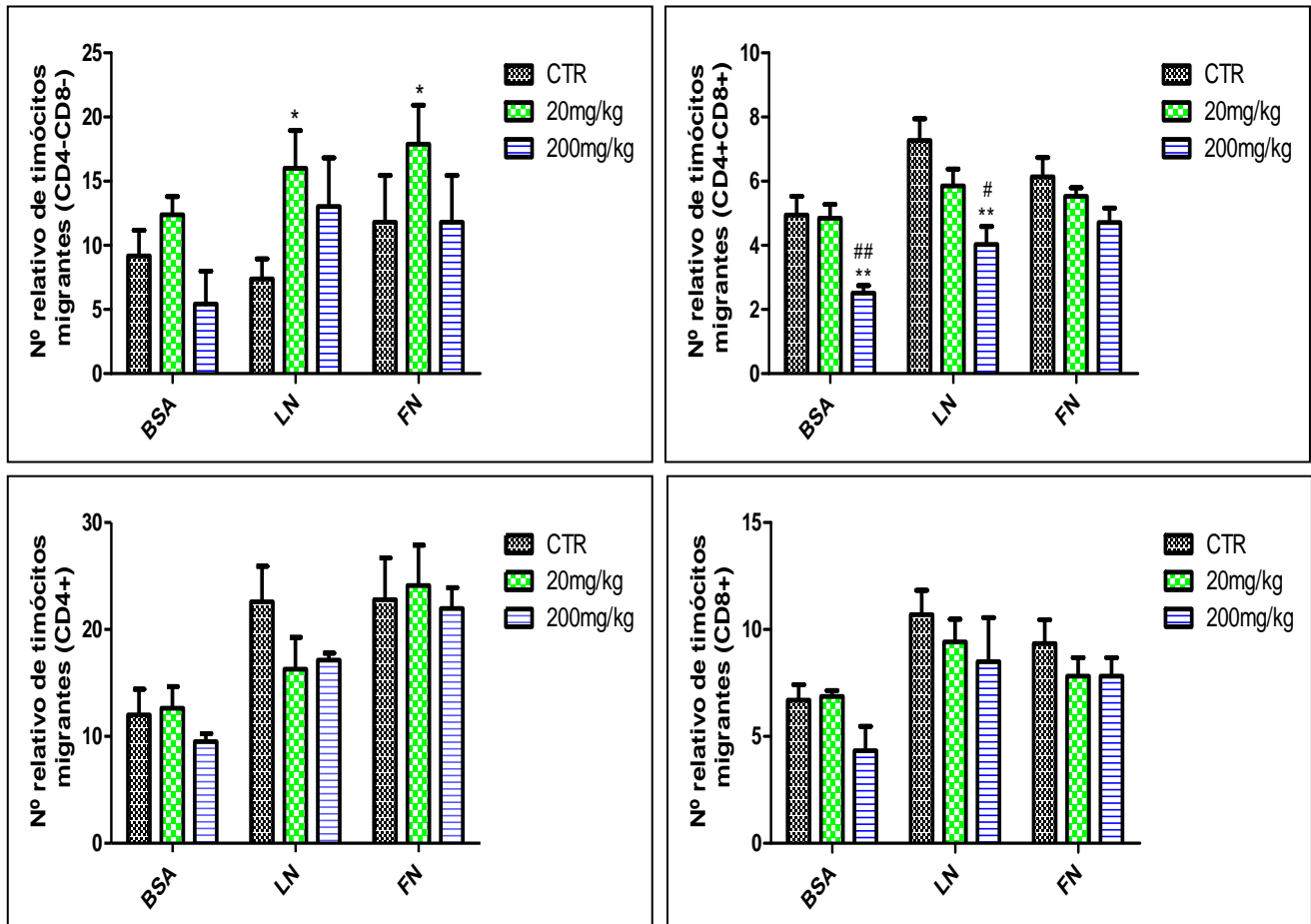
**Figura 14. Efeito do EABv sobre a expressão da integrina VLA-6 na superfície de timócitos aderentes.** O painel mostra a detecção, por citometria de fluxo, do receptor para laminina, VLA-6, na superfície de timócitos após adesão frente ao BSA, laminina ou fibronectina. O traço citofluorimétrico em preto representa a marcação obtida com imunoglobulina não relacionada. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.



**Figura 15. Efeito do EABv sobre o número de timócitos migrantes.** As células foram obtidas de animais tratados, via oral, com solução salina (CTR) ou com o extrato nas doses de 20 ou 200 mg/kg, por 7 dias. Os dados estão representados pela média  $\pm$  EPM (n=8). A análise estatística foi feita com o teste *two-way* ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. \*\*p<0,01 com relação ao grupo CTR correspondente. # p<0,05 com relação ao grupo EABv 20mg/kg correspondente.

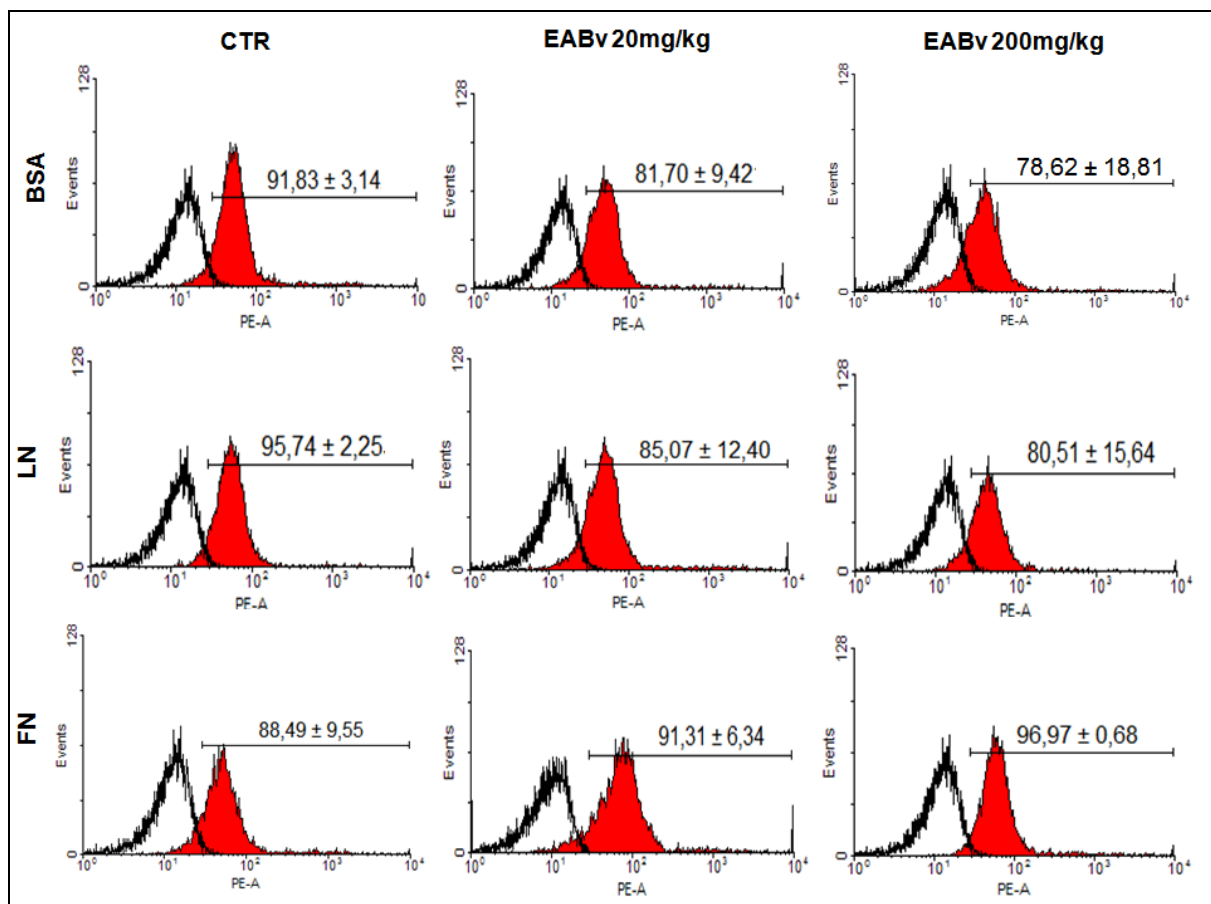
Com a finalidade de verificar o efeito do EABv no fenótipo dos timócitos migrantes, foram realizadas análises citofluorimétrica com marcação para as moléculas de superfície celular CD4 e CD8. Tendo como parâmetro o número de células migrantes, foi comparado o perfil das diferentes subpopulações em relação aos percentuais observados antes da migração, representado pelo percentual de *input*, descrito na sessão 4.10 do Material e Métodos.

O EABv foi capaz de interferir apenas na migração dos timócitos imaturos, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Pois, foi mostrado que o extrato na dose de 20 mg/kg aumentou de maneira significativa a atividade migratória da subpopulação de células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> tanto frente a laminina como frente a fibronectina. No entanto, após o tratamento com EABv na dose de 200 mg/kg foi notada uma diminuição significativa na migração dos timócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> frente ao BSA e a laminina (Figura 16).

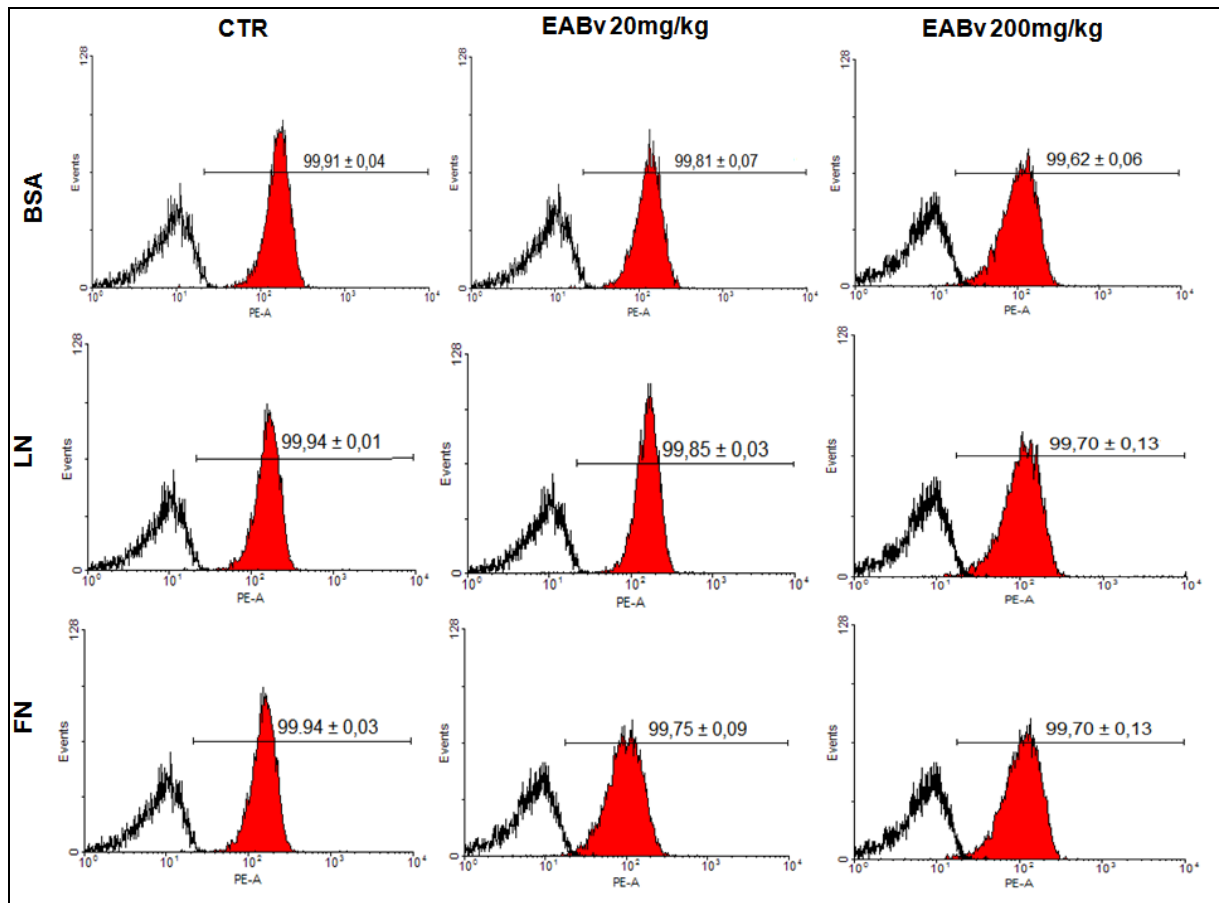


**Figura 16. Efeito do EABv sobre fenótipo CD4/CD8 de timócitos migrantes.** As células foram obtidas de animais tratados, via oral, com solução salina (CTR) ou com o extrato nas doses de 20 ou 200 mg/kg, por 7 dias. Os dados estão representados pela média  $\pm$  EPM ( $n=8$ ). A análise estatística foi feita com o teste *two-way* ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  em relação ao grupo CTR correspondente. # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$  em relação ao grupo 20mg/kg correspondente.

Ainda, constatou-se que o EABv não foi capaz de interferir na expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 na superfície dos tímócitos após a migração frente a BSA, LN ou FN, quando comparado ao controle (Figura 17 e 18).



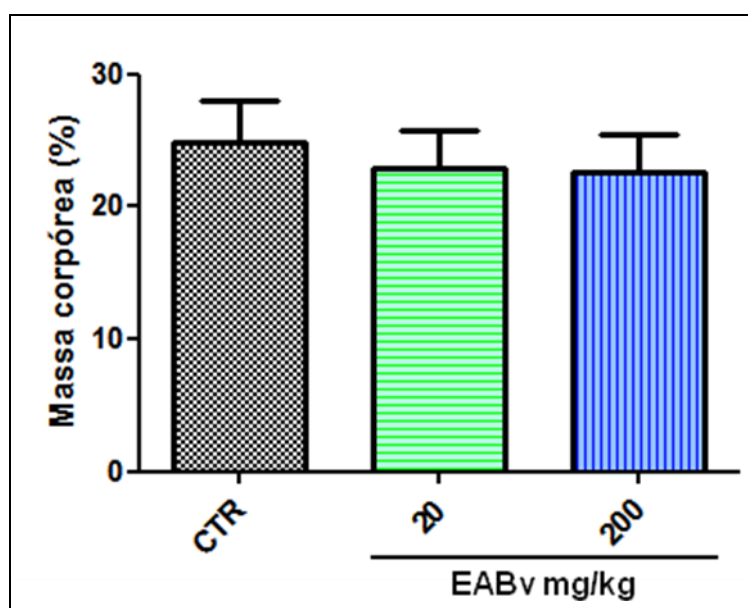
**Figura 17. Efeito do EABv sobre a expressão da integrina VLA-5 na superfície de tímócitos migrantes.** O painel mostra a detecção, por citometria de fluxo, do receptor para fibronectina, VLA-5, na superfície de tímócitos após a migração frente ao BSA, laminina ou fibronectina. O traço citofluorimétrico em preto representa a marcação obtida com imunoglobulina não relacionada. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.



**Figura 18. Efeito do EABv sobre a expressão da integrina VLA-6 na superfície de timócitos migrantes.** O painel mostra a detecção, por citometria de fluxo, do receptor para laminina, VLA-6, na superfície de timócitos após a migração frente ao BSA, laminina ou fibronectina. O traço citofluorimétrico em preto representa a marcação obtida com imunoglobulina não relacionada. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.

### 5.5 Avaliação do potencial tóxico do EABv

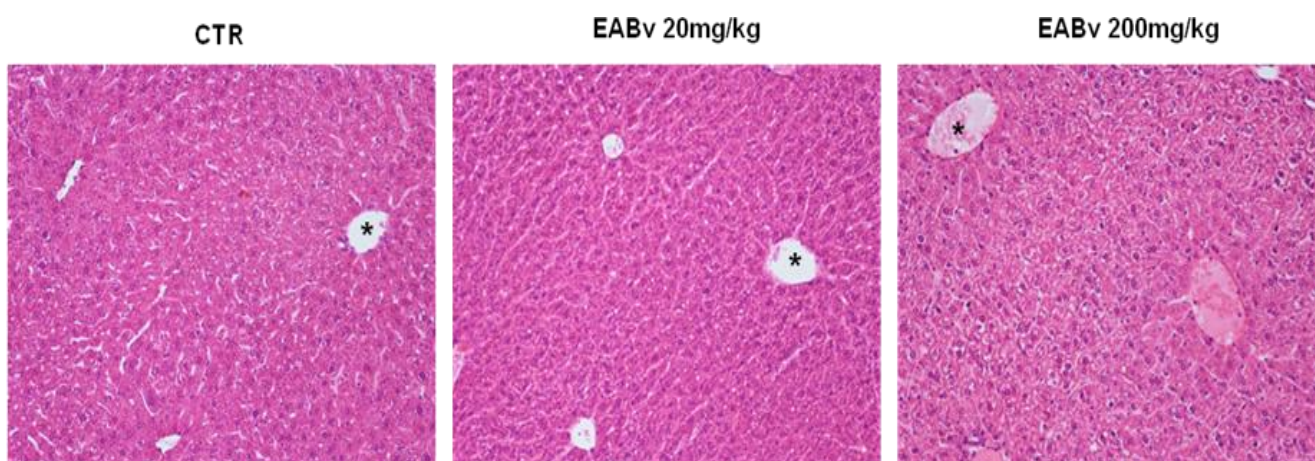
Para avaliar o potencial tóxico do EABv, os animais foram acompanhados diariamente e sob esses tratamentos não foi observada morte, nenhuma alteração comportamental (ambientação, agressividade, piloereção e mobilidade), como também, não foi observado perda na massa corpórea (Figura 19).



**Figura 19. Efeito do EABv sobre a massa corpórea (%) de camundongos.** Os animais receberam por via oral solução salina (CTR) ou EABv nas doses de 20 ou 200 mg/kg por 7 dias. Os dados estão representados pela média  $\pm$  EPM (n=13).

Além disso, foi avaliada a possível hepatotoxicidade desse extrato, ao realizar análise histológica do fígado desses animais. Para isso, foram analisados cortes histológicos do fígado proveniente dos camundongos dos diferentes grupos, corados por HE.

Observou-se microarquitetura normal dos lóbulos hepáticos nos cortes provenientes dos animais do grupo controle e do grupo tratado com o EABv na dose de 20 mg/kg, com os hepatócitos organizados em placas, que se anastomosam e, irradiam-se a partir da veia centrolobular em direção a periferia do lóbulo hepático, percebeu-se também os espaços contendo sinusóides entre as placas de hepatócitos. Já na análise dos animais do grupo tratado com o EABv na dose de 200 mg/kg foi evidenciado alterações no parênquima hepático, apresentando dilatação da veia centrolobular quando comparado aos animais do grupo que receberam a solução salina (Figura 20).



**Figura 20. Efeito do EABv sobre o fígado de camundongos.** Fotomicrografias de cortes parafinados do fígado provenientes de animais tratados por via oral com solução salina (CTR) ou EABv nas doses de 20 ou 200 mg/kg por 7 dias. Coloração hematoxilina-eosina. \* veia central; Aumento de 200x.





O timo fornece um microambiente especializado que participa de eventos essenciais na diferenciação intratímica, capaz de gerar um repertório de células T, restrito ao MHC e tolerante às proteínas próprias do organismo (ANDERSON & JENKINSON, 2001). O estroma tímico possui fenótipos heterogêneos o que reflete sua especialização funcional, sendo que as células do microambiente tímico, sob controle de diferentes interações moleculares, direcionam o desenvolvimento e maturação dos timócitos (JAMESON *et al.*, 1995; ANDERSON & JENKINSON, 2001; STARR *et al.*, 2003).

Apesar da importância da fisiologia desse órgão na geração do repertório de células T, pouco se sabe sobre ações de produtos de origem natural na modulação da função tímica e da resposta imune. Assim, nesse estudo foram abordadas questões relacionadas aos possíveis efeitos do extrato aquoso de *Bowdichia virgilioides* sobre o microambiente tímico, com o intuito de melhor compreender a ação de estímulos exógenos na fisiologia do timo e a descoberta de novas plantas com potencial imunomodulador.

Inicialmente, verificou-se que o tratamento *in vivo* com EABv, nas doses de 20 e 200 mg/kg por sete dias, foi capaz de reduzir o peso e a celularidade do timo. A diminuição no número de timócitos também foi evidenciada ao analisar os cortes histológicos do timo, onde se observou um maior espaçamento entre as células e uma aparente redução da região cortical. Esses achados indicam um possível efeito imunossupressor e imunotóxico desse extrato, uma vez que segundo Pearse e colaboradores (2009), imunotoxicidade é um efeito adverso direto ou indireto provocado por uma substância química sobre o sistema imunológico, resultando na supressão ou exacerbação da resposta imune. Essa toxicidade pode ser acompanhada por alterações no peso, celularidade e/ou alterações na microarquitetura dos órgãos linfóides.

Estudos anteriores realizados com espécies pertencentes à família Fabaceae, demonstraram o potente efeito imunossupressor dessa família, uma vez que, o extrato aquoso de *Caragana sinica* e *Caragana arborescens* foi capaz de reduzir o número de linfócitos T e os níveis de anticorpos produzidos em camundongos (MENG *et al.*, 2009). Outro estudo conduzido em galinhas

mostrou que a administração de *Senna occidentalis* promoveu efeito imunotóxico ao reduzir o peso e a celularidade do baço e da bursa de Fabricius (HUEZA *et al.*, 2007), e ainda, quando ratos foram alimentados com *Phaseolus vulgaris*, exibiram intensa atrofia no timo e baço, com acentuada diminuição do peso relativo do timo e alteração na organização histológica desse órgão (TORO *et al.*, 1992).

No entanto, o único relato existente na literatura a respeito da ação da *B. virgilioides* em modular o sistema imunológico, é o estudo de Velozo e colaboradores (1999), no qual foi isolado do extrato metanólico das raízes da *B. virgilioides* um isoflavonóide que demonstrou atividade imunossupressora *in vitro* ao inibir a proliferação de linfócito B e T induzida por mitógeno. Esse achado aponta que tal composto pode ser um possível agente terapêutico com aplicação em desordens imunoregulatórias.

Motivados pela possível ação imunossupressora apresentada pelo EABv, buscou-se investigar o impacto do tratamento sobre o fenótipo CD4/CD8 dos timócitos. Para isso, foi realizada a análise por citometria de fluxo e mostrou-se que o tratamento com o EABv foi capaz de reduzir o número de timócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, no entanto, nenhuma interferência do extrato foi observada no número de timócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. De acordo com os achados, pode-se supor que o EABv não altera o número de células provenientes da medula óssea, mas é capaz de interferir na diferenciação intratímica dos timócitos. Isto sugere que o EABv atue inibindo a proliferação e/ou apresente um efeito apoptótico nessas células *in vivo*. No entanto, estudos futuros sobre o efeito do EABv em ciclo celular e apoptose de timócitos serão necessários para melhor compreensão se tais hipóteses se confirmam ou não.

Em concordância com os resultados encontrados, outros trabalhos mostraram que o tratamento *in vivo* com diferentes antineoplásicos, glicocorticóides e neuropeptídeos, foi capaz de reduzir algumas das subpopulações de timócitos. É o caso da ciclofosfamida, que ao ser administrada em camundongos da linhagem BALB/c, causou redução no número de timócitos das subpopulações CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, acompanhada de diminuição no peso do timo, redução da região cortical e

número total de timócitos, entre dois e quatorze dias após sua exposição (MIYAUCHI *et al.*, 1990). Também foi demonstrada uma redução no número de timócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> em coelhos após o tratamento com dexametasona por dois dias (JEKLOVA *et al.*, 2008). Os glicocorticóides causam a atrofia do timo e, em menor grau, a atrofia dos outros órgãos linfóides, provocando a morte por apoptose dos precursores imaturos de células T e B (CROSTEIN *et al.*, 1992). E ainda, em estudos com a somatostatina, quando administrada em ratos, foi observada uma diminuição no número de timócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e um aumento no número de timócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, indicando que a somatostatina altera a diferenciação CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> para CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, podendo ser considerada um potente inibidor da proliferação das células T e também um indutor de apoptose celular. Além disso, foi demonstrado que a somatostatina reduziu o peso do timo com diminuição da região cortical, sugerindo que esse neuropeptídeo induz a perda de tecido linfóide (PETROVIC-DERGOVIC *et al.*, 2007).

Levando-se em conta as inúmeras interações que ocorrem durante o processo de maturação intratímica dos timócitos, a modulação observada no fenótipo CD4/CD8 das células T, pode ser também resultado da alteração na deposição de componentes da matriz extracelular no microambiente tímico. A matriz extracelular é constituída por um complexo de moléculas que está presente em todos os tecidos e órgãos, sendo essenciais nos processos de migração, diferenciação e maturação celular (BERRIER & YAMADA, 2007). No timo, a matriz extracelular forma uma rede estrutural constituída por moléculas que apresentam grande atividade de ligação entre si e com receptores expressos na superfície celular. Tais moléculas correspondem a proteínas fibrosas como os colágenos e a elastina, as glicoproteínas e os glicosaminoglicanos. As glicoproteínas da MEC, tais como laminina e fibronectina, estão distribuídas de forma heterogênea no parênquima tímico, sendo produzidas por distintas células do microambiente (SAVINO *et al.*, 2004). Diante disso, foi realizado o ensaio de imunofluorescência indireta em cortes congelados do timo, utilizando marcadores específicos para fibronectina e laminina, o que permitiu observar uma maior deposição dessas moléculas em todo o parênquima tímico dos animais tratados com o EABv. Esse aumento na deposição de moléculas de MEC pode ser mais um indício do efeito

imunossupressor desse extrato. Felton e colaboradores (2011) demonstraram que linhagem de células epiteliais brônquicas quando tratadas com substâncias imunossupressoras tais como ciclosporina, azatioprina e micofenolato aumentam a expressão de proteínas de MEC, fibronectina e colágeno.

Em concordância com esses resultados, outras substâncias também são capazes de modular a deposição de glicoproteínas. Como por exemplo, glicocorticóides e hormônios tireóideos, os quais estimulam a deposição de moléculas de MEC, como fibronectina, laminina e colágeno IV, por células epiteliais tímicas (LANNES-VIEIRA *et al.*, 1991; RIBEIRO-CARVALHO *et al.*, 2007).

Sabe-se que o sistema imunológico é um alvo em potencial dos produtos químicos estranhos ao organismo, e que um dos efeitos tóxicos desses xenobióticos é manifestado por alterações nos órgãos linfóides. Em estudos realizados com carbendazim, um fungicida utilizado na agricultura, foi demonstrado um aumento, dose-dependente, na deposição de fibronectina no timo de ratos tratados por 15 semanas com esse agrotóxico, além de redução no peso do timo acompanhado da presença de edema e fibrose nesse órgão. Embora, as glicoproteínas atuem em uma série de importantes eventos celulares, especialmente na adesão e migração celular, a presença da fibronectina é mais evidente na ocorrência de eventos específicos, como: migração celular, cicatrização e fibrose. Portanto, a maior deposição de fibronectina no timo de ratos tratados com carbendazim é explicada pela presença de regiões de fibrose devido ao efeito tóxico desse fungicida (SONGÜR *et al.*, 2005). Com relação ao EABv, o aumento na deposição das moléculas da MEC pode também indicar um efeito imunotóxico do extrato, mesmo não sendo possível observar a presença de tecido fibroso, fato que pode ser atribuído a curta duração do tratamento.

As integrinas são heterodímeros  $\alpha\beta$  presentes na superfície celular que medeiam as interações entre o ambiente extracelular e o citoesqueleto de actina, sendo importante na regulação da migração celular e nas adesões celulares a MEC. A cadeia  $\alpha5$  liga-se à sub-unidade  $\beta1$  formando o receptor de fibronectina (VLA-5; CD49e). Já a cadeia  $\alpha6$  liga-se à sub-unidade  $\beta1$  formando

o receptor de laminina (VLA-6; CD49f) (HUMPHRIES *et al.*, 2006). Desta forma, com o propósito de avaliar o envolvimento do EABv na expressão dessas integrinas, os timócitos proveniente dos diferentes grupos foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que o extrato, nas concentrações estudadas, não foi capaz de modular a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6 na superfície dos timócitos quando comparados ao grupo controle. Da mesma maneira, foi observado por Smaniotto e colaboradores (2005), que o GH não alterou a expressão membranar dos receptores VLA-4, VLA-5 e VLA-6 nos timócitos. No entanto, foi demonstrado aumento na expressão da integrina VLA-6 no microambiente tímico, sugerindo assim, que os mecanismos que controlam a expressão dessa molécula em tímocitos e em TECs não são os mesmos. Suportando esta hipótese, foi mostrado por Cotta-de-Almeida e colaboradores (2004), um defeito na expressão do receptor para fibronectina, VLA-5, em timócitos de camundongos diabéticos não obesos (NOD) e essa alteração não foi observada nas TECs dos mesmos animais.

A adesão celular é um evento necessário à migração intratímica dos timócitos, uma vez que, favorece o contato entre as células em diferenciação e as células do microambiente tímico, com a participação de moléculas de MEC e seus receptores (SAVINO *et al.*, 2004; GAMEIRO *et al.*, 2010). Nesse contexto, foram realizados ensaios de adesão celular, em substrato de laminina e fibronectina, onde se observou que o EABv na dose de 20 mg/kg foi capaz de reduzir a adesão dos timócitos frente à laminina, e essa redução foi observada em todas as subpopulações CD4/CD8 de timócitos aderentes frente a essa molécula, porém, sem alterar o perfil de expressão de receptores de MEC, VLA-5 e VLA-6.

Estudos realizados com camundongos NOD mostraram uma diminuição na adesão frente à FN, devido à reduzida expressão do receptor VLA-5 na superfície dos timócitos (COTTA-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004), e trabalhos realizados com GH, demonstraram que esse hormônio foi capaz de aumentar a adesão dos timócitos frente à laminina, embora não interferiu no fenótipo CD4/CD8 dessas células, assim como também não interferiu na expressão das integrinas (SMANIOTTO *et al.*, 2005).

A diferenciação intratímica dos linfócitos T é um processo dependente da migração celular, envolvendo os eventos de adesão e de-adesão com a participação de ligantes e receptores de MEC (SAVINO *et al.*, 2004). Diante da capacidade do EABv em reduzir a adesão dos timócitos e da importância das moléculas de MEC no direcionamento dos timócitos ao longo da maturação intratímica, buscou-se avaliar a influência do extrato na migração dos timócitos frente à fibronectina e a laminina. Os resultados mostraram que o EABv, na dose de 200 mg/kg, foi capaz de reduzir de forma significativa o número total de timócitos migrantes frente à laminina, sem alterar a migração dessas células frente à fibronectina. Ao analisar o número relativo das subpopulações de timócitos migrantes, tratados com EABv na dose de 200 mg/kg, foi observada uma redução significativa na atividade migratória das células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> frente ao BSA e essa redução também foi verificada frente à laminina. Porém, quando foi analisada a migração frente à fibronectina, não houve diferença das células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> migrantes entre os grupos tratados ou não com o EABv. No entanto, quando a análise foi realizada sobre a atividade migratória considerando o número relativo de timócitos DN, observou-se que o EABv, na dose de 20 mg/kg, aumentou a migração dessas células frente à fibronectina e a laminina. A atuação do extrato sobre a migração celular foi restrita ao timócitos imaturos, não interferindo significativamente sobre os timócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Em relação às integrinas, como foi observado nos timócitos *a fresco* e após a adesão, o extrato também não influenciou na expressão dos receptores para fibronectina, VLA-5 e para laminina, VLA-6 na superfície de timócitos migrantes.

Assim, a modulação negativa da adesão e da migração celular observada nos animais tratados com EABv, em que não foram observadas alterações na expressão dos receptores VLA-5 e VLA-6 na superfície celular, pode ser resultado da fraca interação e/ou ausência da ativação das moléculas receptoras na superfície dos timócitos. No entanto, os mecanismos intracelulares envolvidos nessas interações sob o efeito do EABv merecem ser estudados.

Foi visto que a atividade sinérgica entre moléculas participa do controle da adesividade e atividade celular em resposta às diferentes condições físico-

químicas do microambiente no qual estão inseridas (MORGAN *et al.*, 2007). Além disso, a organização espacial das células nos tecidos requer uma rede sofisticada de sinais extracelulares para controlar a sobrevivência, a proliferação, a migração e o posicionamento. Estes processos celulares são mediados por complexos mecanismos de adesão envolvendo receptores, as integrinas, que co-operam com outros tipos de receptores em associação com moléculas de MEC para controlar as funções diferenciadas das células (STREULI & AKHTAR, 2009). Foi observado que a co-localização de sindicans e as integrinas  $\beta 1$  nos sítios membranares em associação com MEC, como a fibronectina, é necessária para a formação da “adesão focal”, sítios de ancoragem células-MEC ricos em receptores que participam dessa interação (MORGAN *et al.*, 2007).

Com o intuito de avaliar os efeitos tóxicos desse extrato foram observados diariamente alguns parâmetros que apresentassem indícios de toxicidade sistêmica, contudo, o tratamento por sete dias com EABv nas doses de 20 e 200 mg/kg, não foi capaz de causar morte, induzir a agressividade ou a piloereção, nem alterar significativamente a massa corpórea, a atividade locomotora e o apetite desses animais. Nossos resultados corroboram com estudos realizados com outros extratos oriundos de espécies pertencentes à família Fabaceae, a exemplo de *Trigonella foenum* e *Cassia Occidentalis*, onde não foram observados sinais de toxicidade, alteração da massa corpórea ou mortalidade (BIN- HAFEEZ *et al.*, 2001; 2003).

Dando continuidade aos estudos toxicológicos, foi avaliado o efeito hepatotóxico do EABv, e observado que esse extrato, na dose de 200 mg/kg, alterou a morfologia do órgão, ao induzir um aumento na dilatação da veia central. Esse achado é sugestivo de hepatotoxicidade leve, uma vez que a alteração hepática observada foi um achado isolado, não associado à presença de necrose, aumento da vacuolização dos hepatócitos, infiltrado celular ou hemorragia. Essas alterações histopatológicas geralmente são encontradas após exposição a substâncias comprovadamente tóxicas para o fígado, como é o caso da planta *Mentha piperita* (AKDOGAN *et al.*, 2004), da carne de *L. lagocephalus* (SAOUDI *et al.*, 2009) e do inseticida organofosforado clorpirifós (AJAY *et al.*, 2005). Além do mais, pesquisas toxicológicas indicam que danos



ao sistema imunológico podem ser causados por pequenas doses de xenobióticos e que os efeitos deletérios dessas substâncias podem se estender aos demais órgãos e tecidos com o aumento da dose ou do tempo de exposição (SONGÜR *et al.*, 2005; HUEZA *et al.*, 2007;).



O presente trabalho avaliou *in vivo* o efeito do tratamento com o extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* no timo de camundongos. Os resultados obtidos neste estudo mostram que o EABv exerce efeitos sobre o sistema imune, uma vez que o tratamento com esse extrato alterou a morfologia e a deposição de moléculas de matriz extracelular no timo, sem modificar a expressão das integrinas VLA-5 e VLA-6, reduziu o peso e a celularidade desse órgão, interferindo na diferenciação intratímica de células T. E ainda, foi capaz de modular negativamente a adesão e a migração de timócitos frente às moléculas da matriz extracelular, fibronectina e laminina. O conjunto de dados sugere que o EABv exerce um efeito imunossupressor, o que sustenta seu uso popular.

Buscando avaliar os efeitos do EABv frente aos órgãos do sistema imunológico, pretende-se avançar nos estudos sobre seus efeitos na fisiologia do timo, no que se refere à morte e diferenciação de timócitos. Ainda, estender os estudos para medula óssea, baço e linfonodos. Além disso, faz-se necessário ampliar o tempo de tratamento com o EABv, a fim de verificar os possíveis efeitos tóxicos desse extrato com o seu uso prolongado.

Por fim, serão realizados estudos fitoquímicos com a *B. virgilioides*, uma vez que é indispensável à análise biológica das frações e das substâncias puras, com o intuito de apontar se o principal componente químico responsável pelo efeito imunossupressor do EABv é realmente determinado ou se sua ação biológica deve-se ao efeito sinérgico de vários compostos.



- ABBAS, A. K & LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ANDERSON, G., MOORE, N. C., OWEN, J. J. T., JENKINSON, E. J. Cellular interactions in thymocyte development. **Annual Review of Immunology**. v. 14, p. 73-99, 1996.
- AHAMED, J. A., MADHIVADHANI, P. Costimulatory role of CXCR4 with pré-TCR and its crosstalk with PI3K in  $\beta$ -selection of thymocytes. **Sci Signal**. v. 3, p. 1-3, 2010.
- AJAY, G., VIJAYTA, D., DHAWAN, D. K. Protective effects of zinco lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. **Chem Biol Interact**. v. 156, p. 131-140, 2005.
- AKDOGAN, M., OZGUNER, M., AYDIN, G., GOKALP, O. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* Labiate and *Mentha spicata* Labiatae on liver tissue in rats. **Hum Exp Toxicol**. v. 23, p. 21-28, 2004.
- ALMEIDA, J. R. G. S., SILVA-FILHO, R. N., NUNES, X. P., DIAS, C. S., PEREIRA, F. O., LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Rev Bras Farmacog**. v. 16, p. 638-641, 2006.
- ALMEIDA, E. E. Caracterização farmacognóstica da espécie *Erythrina falcata* Benth., Fabaceae. **Rev Bras Farmacog**. v. 20, p. 100-105, 2010.
- ALVES, T. M. A., SILVA, A. F., BRANDÃO, M., GRANDI, T. S. M., SMÂNIA, E. F. A., SMÂNIA J A., ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 95, p. 367-373, 2000.
- ANDERSON, G., JENKINSON, E. J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. **Nat Rev Immunol**. v. 1, p. 31-40, 2001.
- ARENAS, L. A. S. & ZURBARÁN, C. B. La matriz extracelular: El ecosistema de La célula. **Salud Uninorte**. v.16, p. 9-18, 2002.
- BARROS, W. M., RAO, V. S.N., SILVA, R. M., LIMA, J. C. S., MARTINS, D. T. O. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* H. B. K stem bark. **An Acad Bras Cienc**. v. 82, p. 609-616, 2010.
- BARTHLOTT, T., KELLER, M. P., KRENGER, W., HOLLANDER, G. A. A short primer on early molecular and cellular events in thymus organogenesis and replacement. **Swiss Med Wkly**. v. 136, p. 365-369, 2006.
- BERRIER, A. L., YAMADA, K. M. Cell-matrix adhesion. **J Cell Physiol**. v. 213, p. 565-573, 2007.
- BIN-HAFEEZ, B., AHMAD, I., HAQUE, R., RAISUDDIN, S. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. **J Ethnopharmacol**. v. 75, p. 13-18, 2001.

- BIN-HAFEEZ, B., HAQUE, R., PANDEY, S., SAYEED, I., RAISUDDIN, S. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. **Int Immunopharmacol.** v. 3, p. 257-265, 2003.
- BLEUL, C. C., CORBEAUX, T., REUTER, A., FISCH, P., MÖNTING, J. S., BOEHM, T. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. **Nature.** v. 441, p. 992-996, 2006.
- BOEHM, T., BLEUL, C. C. The evolutionary history of lymphoid organs. **Nat Immunol.** v. 8, p. 131-135, 2007.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guideline for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res.** v. 33, p. 179-189. 2000.
- CIOFANI, M., ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. The thymus as an inductive site for T lymphopoieses. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 23, p. 463-493, 2007.
- COTTA-DE-ALMEIDA, V., VILLA-VERDE, D. M. S., LEPAULT, F., PLÉAU, J., DARDENE, M., SAVINO, W. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: a fibronectin receptor defect. **Eur J Immunol.** v. 34, p. 1578-1587, 2004.
- CRONSTEIN, B. N., KIMMEL, S. C., LEVIN, R. I., MARTINIUK, F., WEISSMAN, G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 89, p. 9991-9995, 1992.
- DEHARO, E., BOURDY, G., QUENEVO, C., MUNOZ, V., RUIZ, G., SAUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana indians. **J Ethnopharmacol.** v. 77, p. 91-98, 2001.
- DE SOUZA, L. R., TRAJANO, V., SAVINO, W. Is there an interspecific diversity of the thymic microenvironment? **Dev Immunol.** v. 3, p. 123-135, 1993.
- ELHABAZI K, DICKO A, DESOR F, DALAL A, YOUNO C, SOULIMANI R. 2006. Preliminary study immunological and behavioural effects of *Thymus broussonetti* Boiss an endemic species in Morocco. **J Ethnopharmacol.** v. 103, p. 413-419, 2006.
- FELTON, V. M., INGE, L. J., WILLIS, B. C., BREMNER, R. M., SMITH, M. A. Immunosuppression-induced bronchial epithelial-mesenchymal transition: a potential contributor to obliterative bronchiolitis. **J Thorac Cardiovasc Surg.** v. 141, p. 523-530, 2011.
- GAMEIRO, J., NAGIB, P. R. A., VERINAUD, L. The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation. **Cell Adh Migr.** v. 4, p. 382-390, 2010.

- GAO, T., YAO, H., SONG, J., LIU, C., ZHU, Y. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potencial DNA barcode ITS2. **J Ethnopharmacol.** v. 130, p. 116-121, 2010.
- GILL, J., MALIN, M., SUTHERLAND, J., GRAY, D., HOLLANDER, G., BOYD, R. Thymic generation and regeneration. **Immunol Reviews.** v. 195, p. 28-50, 2003.
- GORDON, J., WILSON, A. A., BLAIR, N. F., SHERIDAN, J., FARLEY, A., WILSON, L., MANLEY, N. R. M., BLACKBURN, C. C. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. **Nature Immunol.** v. 5, p. 546- 553, 2004.
- GUERRA, R. A., LIMA, E. O., VIEIRA, W. L., FREIRE, K. R. L., TRAJANO, V. N., LIMA, I. O., SOUZA, E. L., TOLEDO, M. S., SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacog.** v. 16, p. 77-82, 2006.
- GRAHAM, A., HARMAN, B. C., HARE, K. J., JENKINSON, E. J. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. **Seminars in Immunology.** v. 12, p. 457-464, 2000.
- GRAY, D. H. D., UENO, T., CHIDGEY, A. P., MALIN, M., GOLDBERG, G. L., TAKAHAMA, Y., BOYD, R. L. Controlling the thymic microenvironment. **Curr Opin Immunol.** v. 17, p. 137-143, 2005.
- HAIJTO, T., HOSTANSKA, K., GABIUS, H. J. Modulatory potency of the B-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador on the host defence system in vivo in rabbits & patients. **J Cancer Res.** v. 49, p. 4803-4808, 1989.
- HERZYK, D. J. AND GORE, E. R. Adequate immunotoxicity testing in drug development. **Toxicol Letters.** v. 149, p. 115-122, 2004.
- HOWARD, M., GARRA, A., ISHIDA, H. Biological properties of interleukin 10. **J Clin Immunol.** v. 12, p. 239-247, 1992.
- HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell.** v. 110, p. 673-687, 2002.
- HUEZA, I. M., LATORRE, A. O., RASPANTINI, P. C. F., RASPANTINI, L. E. R., MARIANO-SOUZA, D. P., GUERRA, J. L., GÓRNIK, S. L. Effect of *Senna occidentalis* seeds on imunity in broiler chickens. **J Vet Med.** v. 54, p. 179-185, 2007.
- HUMPHRIES, J. D., BYRON, A., HUMPHRIES, M. J. Integrin ligands at a glance. **J Cell Sci.** v. 119, p. 3901-3903, 2006.
- INGHAM KC, BREW SA, ERICKSON HP. Localization of a Cryptic Binding Site for Tenascin on Fibronectin. **J Biol Chem.** v. 279, p. 132-135, 2004.
- IMAI, Y., SHIMAOKA, M., KUROKAWA, M. Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. **Int J Hematol.** v. 91, p. 569-575, 2010.

- JAMESON, S. C., HOQUIST, K. A., BEVAN, M. J. Positive selection of thymocyte. **Ann Rev Immunol.** v. 13, p. 93-126, 1995.
- JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M. **Imunobiologia** – O sistema imunológico na saúde e na doença. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- JEKLOVA, E., LEVA, L., JAGLIC, Z., FALDYNA, M. Dexamethasone-induced immunosuppression: a rabbit model. **Veterin Immunol and Immunopath.** v. 122, p. 231-240, 2008.
- JENKINSON, W. E., BACON, A., WHITE, A. J., ANDERSON, G., JENKISON, E. J. An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. **J Immunol.** v. 181, p. 6101-6108, 2008.
- JUCK, D. B. F., REZENDE, L. C., DAVID, J. P., QUEIROZ, L. P., DAVID, J. M. Two new isoflavonoids from *Bowdichia virgilioides*. **Natural Product Research.** v. 20, p. 27-30, 2006.
- KIM, M. G., LEE, G., LEE, S., LOLKEMA, M., YIM, J., HONG, S. H., SCHWARTZ, R. H. Epithelial Cell-specific laminin 5 s required for survival of early thymocytes. **J of Immunol.** v. 165, p.192-201, 2000.
- KOVACEVIC, N., COLIC, M., BACKOVIC, A., DOSLOV-KOKORUS, Z. Immunomodulatory effects of the methanolic extract of *Epimedium alpinum* in vitro. **Fitoterapia.** v. 77, p. 561-567, 2006.
- KUTTAN, G., KUTTAN, R. Immunomodulatory activity of a peptide isolated from *Viscum album* extract. **Immunol Invest.** v. 21, p. 285-296, 1996.
- LANNES-VIEIRA, J., DARDENNE, M., SAVINO, W. Extracellular matrix componentes of the mouse thymus microenvironment Ontogenetic studies and modulation by glucocorticoids hormones. **J Histochem Cytochem.** v. 39, p. 1539-1546, 1991.
- LIMA, F. A., CARNEIRO-SAMPAIO, M. O papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. **Pediatria.** v. 29, p. 33-42, 2007.
- MADRI, J., GRAESSER, D. Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. **Developm Immunol.** v. 7, p. 103-116, 2000.
- MATSUNO, Y., DEGUCHI, J., HIRASAWA, Y., OHYAMA, K., TOYODA, H., HIROBE, C., EKASARI, W., WIDYAWARUYANTI, A., ZINI, N. C., MORITA, H. Sucutiniranes A and B, new cassane-type diterpenes from *Bowdichia nitida*. **Bioorg Med Chem.** v. 18, p. 3774-3777, 2008.
- MATSUNO, Y., DEGUCHI, J., HOSOYA, T., HIRASAWA, Y., HIROBE, C., SHIRO, M., MORITA, H. Sucutiniranes C-F, Cassane-Type Diterpenes from *Bowdichia nitida*. **J Nat Prod.** v. 72, p. 976-979, 2009.
- MEIRELES DE SOUZA, L. R., TRAJANO, V., SAVINO, W. Is There na interspecific diversity of the thymic microenvironment? **Dev Immuno.** v. 3, p. 123-135, 1993.



MELO, F. N., NAVARRO, V. R., SILVA, M. S., CUNHA, E. V. L., BARBOSA-FILHO, J. M., BRAZ-FILHO, R. Bowdenol, a 2,3-dihydrobenzofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*. **Natural Product Letters**. v. 15, p. 261-266, 2001.

MENDES-DA-CRUZ, D. A., SMANIOTTO, S., KELLER, A. C., DARDENE, M., SAVINO, W. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. **J Immunol**. v. 180, 4639-4647, 2008.

MENG, Q., NIU, Y., ROUBIN, R. H., HANRAHAN, J. R. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of the genus *Caragana* used in traditional Chinese medicine. **J Ethnopharmacol**. v. 124, p. 350-368, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. 2006. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_naciona\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_naciona_fitoterapicos.pdf). Acessado em 02/12/10.

MIYAUCHI, A., HIRAMINE, C., TANAKA, S., HOJO, K. Differential effects of a single dose of cyclophosphamide on T cell subsets of thymus and spleen in mice: flow cytometry analysis. **Tohoku J Exp Med**. v. 162, p. 147-167, 1990.

MORGAN, M. R., HUMPHRIES, M. J., BASS, M. D. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 8, p. 957-968, 2007.

OCAMPO, J. S. P., BRITO, J. M., CORRÊA-DE-SANTANA, E., BOROJEVIC, R., VILLA-VERDE, D. M. S., SAVINO, W. Laminin-211 controls thymocyte-thymic epithelial cell interactions. **Cellular Immunology**. v. 254, p. 1-9, 2008.

OHL, L., BERNHARDT, G., PABST, O., FORSTER, R. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. **Seminars Immunol**. v. 15, p. 249-255, 2003.

PAESSENS, L. C., FLUITSMA, D. M., VAN KOOYK, Y. Haematopoietic antigen-presenting cells in the human thymic cortex: evidence for a role in selection and removal of apoptotic thymocytes. **J Pathol**. v. 214, p. 96-103, 2008.

PATWARDHAN, B., GAUTAM, MANISH. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. **Drug Discovery Today**. V. 10, p. 496-502, 2005.

PEARSE, G., PIETERSMA, A., CUNLIFFE, J., FOSTER, J.R., TURTON, J., DERBYSHIRE, N., RANDAL, K, J. Time-course study of the immunotoxic effects of the anticancer drug clorambucil in the rat. **Toxicol Pathology**. v.37, p. 887-901, 2009.

PETRIE, H. T., ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. **Annu Rev Immunol**. v. 25, p. 649-679, 2007.

PETROVIC-DERGOVIC, D. M., RAKIN, A. K., DIMITRIJEVIC, L. A., RISTOVSKI, J. S., KUSTRIMOVIC, N. Z., MICIC, M. V. Changes in thymus

size, cellularity and relation between thymocyte subpopulations in young adult rats induced by Somatostatin-14. **Neuropeptides**. v. 41, p. 485-493, 2007.

PEZZANO, M., SAMMS, M., MARTINEZ, M., GUYDEN, J. Questionable thymic nurse cell. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 65, p. 390-403, 2001.

PROIETTO, A., VAN DOOMELEN, S., WU, L. The impact of circulation dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. **Immunol Cel Biol**. v. 87, p. 39-45, 2009.

RIBEIRO-CARVALHO, M. M., LIMA-QUARESMA, K. R. F., MOUÇO, T., VARVALHO, V. F., MELLO-COELHO, V., SAVINO, W. Triiodothyronine modulates thymocyte migration. **Scandinavian J Immunol**. v. 66, p. 17-25, 2007.

RODRIGUES, M. O., ALVES, P. B., NOGUEIRA, P. C. L., MACHADO, S. M. F., MORAES, V. R. S. Volatile Constituents and Antibacterial Activity From Seeds of *Bowdichia virgilioides* Kunth. **J Essent Oil Res**. v. 21, p. 286-287, 2009.

SANTOS, L. C., AMORIM, M. M. R. Uso da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para Tratamento de infecções vaginais. **Femina**. p. 1-4, 2002.

SAVINO, W., DALMAU, S. R., COTTA-DE-ALMEIDA, V. Role of extracellular matrix-mediated interactions in the thymocyte migration. **Develop Immunol**. v. 7, p. 279-291, 2000.

SAVINO, W., DARDENNE, M. Neuroendocrine control of thymus physiology. **Endocr Rev**. v. 21, p. 412-443, 2000.

SAVINO, W., MENDES-DA-CRUZ, D. A., SMANIOTTO, S., SILVA-MONTEIRO, E., VILLA-VERDE, D. M. S. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. **J Leuk Biol**. v. 75, p. 1-11, 2004.

SAVINO, W. Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. **Exp. Physiol**. v. 92, p. 813-817, 2007.

SAVINO, W., DARDENNE, M. Pleiotropic modulation of thymic functions by growth hormone: from physiology to therapy. **Current opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 1-9, 2010.

SILVA, J. P., RODARTE, R. S., CALHEIROS, A. S., SOUZA, C. Z., AMENDOEIRA, F. C., MARTINS, M. A., SILVA, P. M. R., FRUTUOSO, V. S., BARRETO, E. Antinociceptive activity of aqueous extract of *Bowdichia virgilioides* in mice. **J Medicinal Food**. v. 13, p. 348-351, 2010.

SINGH, G. B., ATAL, C. K. Pharmacology of an extract of salai gugal ex-*Boswellia serrata*, new non-steroidal anti-inflammatory agents. **Agents Actions**. v. 8, p.407-12, 1986.

SMANIOTTO, S., MELLO-COELHO, V., VILLA-VERDE, D. M., PLÉAU, J. M., POSTEL-VINAY, M. C., DARDENNE, M., SAVINO, W. Growth hormone

modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12. **Endocrinology**. v. 146, p. 3005-3017, 2005.

SOLOMON, F. E., SHARADA, A. C., DEVI, U. P. Toxic effects of crude root extract of *Plumbago rosea* (Rakta chitraka) on mice and rats. **J Ethnopharmacol**. v. 38, p. 79-84, 1993.

SONE, S., HIGASHIHARA, T., SHIZUO, M., MORIMOTO, S., YOKOTA, K., IKEZOE, J., MASAOKA, A., MONDEN, Y., KAGOTANI, T. Normal anatomy of thymus and anterior mediastinum by pneumomediastinography. **American J of Roentgenology**, v. 134, p. 81-89, 1980.

SONGÜR, S. H., KOÇKAYA, E. A., SELMANOĞLU, G., BARLAS, NURHAYAT. Dose-dependent effects of carbendazim on rat thymus. **Cell Biochem and Funct**. v. 23, p. 457- 460, 2005.

SOUDI, M., ABDELMOULEH, A., ELLOUZE, F., JAMOSSI, K., EL FEKU, A. Oxidative stress and hepatotoxicity in rats induced by poisonous pufferfish (*Lagocephalus lagocephalus*) meat. **J Venon Anim Toxins incl Trop Dis**. v. 15, p. 424-443, 2009.

STARR, T. K., JAMESON, S. C., HOGQUIST, K. A. Positive and negative selection of T cells. **Annu Rev Immunol**. v. 21, p. 139-176, 2003.

STITES, P. D., TERR, A. I., PARSOLW, T. C. **Imunologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2000.

STREULI, C. H., AKHTAR, N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. **Biochem J**. v. 418, p. 491-506, 2009.

SU, D., NAVARRE, S., OH, W., CONDIE, B. G., MANLEY, N. R. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. **Nature Immunol**. v.4, p. 1128-1135, 2003.

THATTE, U. M. Ayurveda: an important source of medicine. **Indian J Clin Pract: Medinews**. p. 5-18, 1996.

THOMAZZI, S. M., SILVA, C. B., SILVEIRA, D. C., VASCONCELLOS, C. L., LIRA, A. F., CAMBUI, E. V., ESTEVAM, C. S., ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **J Ethnopharmacol**. v. 127, p. 451-456, 2010.

TIMOTHY, A. S., WANG, J. The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. **Advances in protein chemistry**. v. 68, p. 29-63, 2004.

TORO, F., BENSHIMOL, A. L., GONZÁLEZ, E. M., SOYANO, A. Spleen and thymus histology and proliferative response of splenic cells in rats fed raw and cooked *Phaseolus vulgaris* beans. **Arch Latinoam Nutr**. v. 42, p. 395-402, 1992.

- TORRENEGRA, R., BAUEREISS, P., ACHENBACH, H. Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgilioides*. **Phytochemistry**. v. 28, p. 2219-2221, 1989.
- TUCKER, S. C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**. v. 131, p. 911-926, 2003.
- TURVEY, S. E. & BROIDE, D. H. Innate immunity. **J Allergy Clin Immunol**. V. 125, p. 24-32. 2010.
- VACCA, A., RIA, R., PRESTA, M., RIBATTI, D., IURLARO, M., MERCHIONNE, F., TANGHETTI, L., DAMMACCO, F.  $\alpha\beta 3$  Integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. **Exp Hematol**. v. 29, p. 993-1003, 2001.
- VAKONAKIS, L., CAMPBELL, I. D. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. **Curr Opin Cell Biol**. v. 19, p. 578-583, 2007.
- VEITCH, N. C. Isoflavonoids of the Leguminosae. **Natural Product Reports**. v. 24, p. 417-467, 2007.
- VELOZO, L. S. M., SILVA, B. P., BERNADO, R. R., PARENTE, J. P. Odorantin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from *Bowdichia virgilioides*. **Phytochemistry**. v. 52, p. 1473-1477, 1999.
- VILLA-VERDE, D. M., MELLO-COELHO, V., LAGROTA-CÂNDIDO, J. M., CHAMMAS, R., SAVINO, W. The thymic nurse cell complex: na in vitro model for extracellular matrix-mediated ntrathymic T cell migration. **Braz J Med Biol Res**. v. 28, p. 907-912, 1995.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from na ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**. v. 64, p. 3-19, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional Medicine. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Acessado em 18.02.10.
- ZHANG, L., SUN, L., ZHAO, Y. Thymic epithelial progenitor cells and thymus regeneration: na update. **Cell Research**. v. 17, p. 50-55, 2007.