



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

ALTAIR ROGÉRIO ALVES BRANDÃO

**Efeito do extrato aquoso da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* KUNTH
na resposta celular e humoral em camundongos.**

**Maceió – AL
2012**

ALTAIR ROGÉRIO ALVES BRANDÃO

**Efeito do extrato aquoso da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* KUNTH
na resposta celular e humoral em camundongos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra.^a Salete Smaniotto

Co-Orientadora: Prof.^a Dra.^a Silvana Ayres
Martins

**Maceió – AL
2012**

FOLHA DE APORVAÇÃO

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.^a Dra. Salete Smaniotto e co-orientação da Prof.^a Dra. Silvana Ayres Martins.

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Maria Albertina Alves Brandão e Ataíde Alves dos Santos, meus irmãos José Roberto Alves Brandão e Robson José Alves Brandão e a um ser humano iluminado que hoje está ao lado de Deus, à minha amada avó Anália Tributino Brandão.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, o inefável, por me dar a vida e por me possibilitar viver ao lado das pessoas que tem cruzado meu caminho durante esses anos. Com certeza estar onde estou hoje, foi um presente de Deus. Nunca me deixes esquecer que tudo que tenho, tudo que sou, o que vier a ser, vem de Ti Senhor! Obrigado por me amparar durante esses anos de luta e por me dar forças para seguir em frente, apesar de todas as dificuldades e provações que a vida nos faz passar!

A minha querida e amada mãe **Maria Albertina**, pelo amor incondicional, pela amizade, amparo, cuidado, carinho e por me fazer ser a cada dia uma pessoa melhor. Seus ensinamentos preciosos, sua força e seu amor, me fazem uma pessoa melhor. Mãe obrigado pela torcida de sempre, por todo apoio e amor, sem a senhora do meu lado, a concretização desse sonho não seria possível! Obrigado por me fazer erguer a cabeça nos momentos difíceis, só nós sabemos o quanto foi difícil chegarmos até aqui! Obrigado também pelas orações que sempre tem feito, Deus e nossa Senhora com certeza ouvem as suas preces. Te amo e sempre amarei incondicionalmente!

A minha amada vó, **Anália Tributino**, que agora está ao lado de Deus e olhando por mim, um exemplo de ser humano inigualável! Todo cuidado e carinho que sempre mostrou. É pela senhora que eu estou concluindo esse trabalho. Obrigado vó por sempre acreditar em mim e sempre me incentivar a buscar coisas maiores, agradeço a Deus todos os dias por ter me dado uma vó como a senhora foi! Seu amor me fez ser mais forte!! Saudade imensa de estar ao seu lado!! Te amo eternamente, sei que um dia iremos nos encontrar, essa esperança é o que me faz continuar!!

Ao meu pai **Ataide Alves**, pelo apoio e cuidado de sempre! Pai, lembro dos conselhos valiosos que o senhor sempre me deu! Pelo carinho, cuidado e amor! Pela sua força de buscar sempre o melhor para mim e estar sempre disposto a me possibilitar coisas maravilhosas! Obrigado meu amado pai!!!

Aos meus irmãos, **José Roberto** e **Robson José**, pelo companheirismo, força, amor e cuidado. Obrigado por sempre acreditarem em mim e me incentivarem na busca do melhor para minha carreira profissional! Valeu pelas dicas preciosas e sugestões! Vocês são muito importantes para mim!

A minha namorada, **Ana Celina**, que ser humano maravilhoso!! Obrigado meu amor por sempre estar ao meu lado em todos os momentos dessa jornada. Você, como poucos, sabe de tudo que tenho passado durante esses últimos anos! Suas palavras de força, amor, carinho me ajudaram a erguer a cabeça e tentar achar um sentido para continuar. Você foi importante e sempre será em minha vida, Deus me deu um presente maravilhoso! Que esse amor cresça a cada dia e espero ficar com você por toda a minha vida!

A minha orientadora, **Profª Salete Smaniotto**, meu muito obrigado!!! Primeiro pela oportunidade, segundo pelo compromisso, respeito, ajuda, que exemplo de profissional. Sempre digo que foi coisa de Deus entrar nesse mestrado, Ele com certeza não poderia me dar uma orientadora a não ser você Salete. Minha gratidão com você é enorme. Obrigado por toda paciência e dedicação e ensinamentos no dia-a-dia e nas aulas de Histologia, quero ser um profissional como você. Se conserve esse ser humilde e simpático que você é. Tenho um carinho enorme por você, muito obrigado por tudo!

A **Profª Silvana Ayres**, minha co-orientada obrigado por tudo! Uma pessoa de uma generosidade enorme! Sempre disposta a ajudar e a buscar o melhor para o trabalho. Obrigado pelas dicas e pela ajuda de sempre! Suas dicas sempre bem vindas e valiosas, seus ensinamentos foram importantes para minha formação profissional. Admiro muito você, uma professora generosa e dedicada!!

Ao grande **Profº Emiliano Barreto**, pelas discussões importantíssimas no laboratório e pelo incentivo diário para sermos profissionais melhores, de buscarmos sempre mais. Obrigado professor pelas contribuições!

A minha amiga e Biomédica **Rebeka Raísa**. Obrigado pelo ser humano que você é! Desde o início do curso e até agora juntos e pra vida toda!!! Minha amiga muito obrigado por ser essa pessoa maravilhosa e sempre estar disposta a me ajudar! Sua ajuda foi muito importante para realização desse sonho! Parabéns pela pessoa e pelo profissional que você é! Espero trabalhar com você na vida profissional!! Você tem um lugar guardado do lado esquerdo do peito!!

A minha grande amiga e colaboradora **Larissa Fernanda**, meu muito obrigado!! Que pessoa acolhedora e amável!! Larissa, você se tornou uma pessoa importantíssima na minha vida! Obrigado por todo apoio incondicional, pela força. Sua ajuda pessoal e profissional me fizeram uma pessoa melhor! O que seria de mim sem suas preciosas palavras, me erguendo, me dando incentivo para continuar. Você contribuiu enormemente para realização desse sonho!! Ser humano generoso e ímpar que você é!

A minha amiga e colaboradora **Maria Danielma**, valeu pelas dicas, ajuda na cultura e nos experimentos! Você foi de extrema importância para mim nesses dois anos de mestrado, não só pela ajuda, mas também pelo companheirismo, conselhos e amizade!!! Minha amiga muito obrigado por tudo, sinto muito sua falta, mas que você crie cada vez mais asas e ganhe o mundo!! Minha gratidão por você é enorme.

Meu grande amigo **Alfredo Junior**, eita quantas provações passamos durante esse mestrado hein??? Mas graças ao nosso bom Deus vencemos!! Meu amigo para toda a vida, quero agradecer por tudo, você foi muito importante nessa conquista e vivenciei comigo as angústias, medos e superações! Obrigado pelo incentivo! Você é um ser humano maravilhoso, obrigado pelas orações que sei que sempre estou presente nelas!! Saiba que você é uma das pessoas que mais me ajudaram nessa jornada, minha gratidão por você é enorme!! Deus é maravilhoso comigo, pois coloca pessoas como você na minha vida!

A minha amiga e madrinha **Amanda Costa**, você sabe do meu carinho por você, sabe também que Deus te colocou no meu caminho naquele dia do vestibular! Você foi um instrumento utilizado por Ele naquele dia, obrigado por todos esses

anos de apoio, minha madrinha maravilhosa! Te amo muito e você faz parte diretamente desse sonho!

A minha amiga/irmã **Diana Santos**, muito grato por todos esses anos de amizade e cumplicidade, obrigado por tudo e agora ainda mais feliz com a chegada do meu afilhado **Anthony**, minha irmã te amo muito! Mil beijos!

Quero agradecer também, a várias pessoas que me ajudaram na concretização desse sonho, **Marli Santos** (pela torcida, palavras animadoras e sempre estar disposta a me erguer nos momentos difíceis), **Betijane Soares** (muita saudade de você), **Mariana, Natália, Delma, Moézio, Bruna Santos e Larissa Oliveira**. A **Fátima Maia** e **Delminha** da Histologia, **Rafael Vital, Iana Viana, Isabela Agra, Laís Costa, Yngrid, Fagner, Araken, Genilda, Thiago, Marvin Paulo** (obrigado pelas palavras preciosas nos momentos mais difíceis), **Jamyllle Ferro** (meu muito obrigado, você é uma pessoa dedicada e ama o que faz, muito bom ter convivido com você esses dois anos de mestrado), **Almair** (minha dupla sertaneja, muito obrigado, você é uma pessoa iluminada, coração enorme, minha gratidão pra você sempre!) e todos que fazem parte do LBC, muito obrigado!!

Ao povo da fronteira pelo apoio, torcida e muitas gargalhadas diárias, meus amigos **Hansmile Douglas, Diana Santos, Rafaela, Júlia, Andréia**. Aos meus amigos do curso de francês **Darlane, Dayse, Irani, Marluce** pelo apoio e pela descontração, muito obrigado, adoro vocês!!! Todos vocês são importantes na minha vida!!

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

RESUMO

Bowdichia virgilioides Kunth, popularmente conhecida como “sucupira-preta”, é espécie utilizada na medicina popular regional no combate a inflamação, doenças auto-imunes e cicatrizante. Ainda são escassos os estudos que tratam da sua atividade biológica, principalmente em relação ao sistema imunológico, o que a torna um alvo em potencial de investigações científicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vivo* a ação do extrato aquoso da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* (EaBv) na resposta imunológica celular e humoral. Foram utilizados camundongos *Swiss* (4-6 semanas) machos, aos quais foi administrado por via oral o EaBv durante 7 dias consecutivos. Inicialmente, utilizando o modelo de zimosan A demonstrou-se que o tratamento com EaBv aumentou a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais residentes. Na contagem de leucócitos do sangue periférico, observou-se uma diminuição no número de leucócitos totais nos animais tratados com EaBv e esta diminuição foi evidenciada no número de neutrófilos quando realizada a contagem diferencial. No entanto, o número de linfócitos aumentou no sangue periférico dos animais após o tratamento. Verificou-se pelo ensaio de hemaglutinação que o EaBv foi capaz de diminuir a produção de anticorpos. O extrato estimulou a proliferação dos linfócitos totais que foram obtidos dos linfonodos mesentéricos após os 7 dias de tratamento. Além disso, interferiu na ação da concanavalina A sobre a proliferação de linfócitos T, e agiu negativamente na ação do lipopolissacarídeo sobre a proliferação de linfócitos B. Ainda, por citometria de fluxo, observou-se que o EaBv aumentou a expressão das citocinas TNF- α nos linfócitos T e IL-10 nos linfócitos B. Entretanto, a expressão de TNF- α pelos linfócitos B foi modulado negativamente pelo extrato. Em conjunto, os resultados sugerem que o extrato aquoso da casca do caule *Bowdichia virgilioides* possui uma atividade imunológica complexa, agindo sobre as respostas imunes celular e humoral.

Palavras-chaves: *Bowdichia virgilioides*. Resposta inata. Resposta celular. Produtos naturais.

ABSTRACT

Bowdichia virgilioides Kunth, popularly known as "sucupira preta", is used in folk regional medicine to combat inflammation, autoimmune diseases and healing. There are only few scientific studies dealing with its biological activity, especially in regards to the immune system, making it a potential target of scientific research. The aim of this study was to evaluate *in vivo* the action of the aqueous extract of *Bowdichia virgilioides*-derived stem bark (EaBv) in cellular and humoral responses. Swiss male mice were used (4-6 weeks), which were administered EaBv orally for 7 consecutive days. Initially using the template of zymosan A showed that treatment with EaBv increased phagocytic capacity of resident peritoneal macrophages. On the peripheral blood leukocytes count, it was observed a decrease in the number of total leukocytes in animals treated with EaBv and this reduction was observed when the differential number of neutrophils counts was performed. However, the increased number of lymphocytes in peripheral blood of animals after treatment. It has been found by the hemagglutination assay EaBv was able to decrease the production of antibodies. The extract stimulated proliferation of lymphocytes which have been obtained from lymph nodes after 7 days of treatment. Also, interfered with the effect of ConA on T lymphocyte proliferation and acted negatively on the action of LPS on the proliferation of B lymphocytes. Furthermore, flow cytometric, it was observed that the EaBv increased expression of TNF- α by T lymphocytes and IL-10 by B lymphocytes. However, expression of TNF- α by B lymphocytes has been modulated negatively by the extract. Together, these results suggest that aqueous extract of *Bowdichia virgilioides*-derived stem bark possesses a complex immune activity, acting on the cellular and humoral immune responses.

Keywords: *Bowdichia virgilioides*. Innate response. Cellular response. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth (Fabaceae).....	36
Figura 2 - Macrófagos peritoneais residentes estimulados por zimosan A (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	40
Figura 3 - Capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais obtidos de animais tratados com extrato aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i>	47
Figura 4 - Efeito do extrato aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> no número total de leucócitos sanguíneos.....	48
Figura 5 - Efeito do extrato aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico.....	50
Figura 6 - Efeito do extrato aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na produção de anticorpos.....	51
Figura 7 - Efeito do extrato aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na proliferação de linfócitos.....	52
Figura 8 - Efeito do extrato aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na proliferação de linfócitos T.....	53
Figura 9 - Efeito do extrato aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na proliferação de linfócitos B.....	54
Figura 10 - Representação esquemática para análise citofluorométrica da expressão de citocinas em linfócitos T e B.....	55
Figura 11 - Efeito do extrato aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na expressão de citocinas em linfócitos T.....	56
Figura 12 - Efeito do extrato aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na expressão de citocinas em linfócitos B.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag - antígeno

APC - célula apresentadora de antígeno

BCR - receptor de célula B (*B cell receptor*)

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

CD3 - marcador de superfície celular para linfócito T

CD4⁺ - célula T auxiliar simples-positiva para a molécula CD4

CD8⁺ - célula T citotóxica simples-positivo para a molécula CD8

CTR - grupo controle

ConA – concanavalina A

DCs - células dendríticas (*dendritic cells*)

EaBv - extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides*

FITC - isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)

HC - hemácia de carneiro

IFN- γ – interferon gama

Ig - imunoglobulina

IL - interleucina

LPS - lipopolissacarídeo

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

NK - células *natural killers*

OMS - Organização Mundial de Saúde

MTT - (3 - (4,5-dimetil-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazolim)

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

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

PE - ficoeritrina (*phycoerythrin*)

PRR - receptor de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors*)

RPMI - mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e outras substâncias necessárias ao crescimento celular

SBF - soro bovino fetal

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

TNF- α - fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Sistema Imunológico.....	22
3.2 Resposta Imune Inata.....	23
3.3 Resposta Imune Adaptativa.....	26
3.3.1 Resposta Imune Humoral.....	27
3.3.2 Resposta Imune Celular.....	30
3.4 Citocinas.....	31
3.5 Produtos Naturais.....	32
3.5.1 <i>Bowdichia virgilioides</i>	34
4. METODOLOGIA.....	37
4.1 Animais.....	38
4.2 Material Vegetal.....	38
4.3 Preparo do Extrato.....	38
4.4 Tratamento <i>in vivo</i> com <i>Bowdichia virgilioides</i>.....	38
4.5 Ensaio de Fagocitose.....	39
4.6 Contagem Total e Diferencial de Leucócitos do Sangue Periférico.....	41
4.7 Ensaio de Hemaglutinação.....	41
4.8 Proliferação de Linfócitos T e B.....	42
4.9 Análise por Citometria de Fluxo.....	43
4.10 Análise Estatística.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Efeito do Extrato Aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na Fagocitose por Macrófagos.....	46
5.2 Efeito do Extrato Aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> Sobre Leucócitos Sanguíneos.....	48
5.3 Efeito do Extrato Aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na Produção de Anticorpos.....	51

5.4 Efeito do Extrato Aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na Proliferação de Linfócitos T e B.....	52
5.5 Efeito do Extrato Aquoso da <i>Bowdichia virgilioides</i> na Expressão de Citocinas.....	54
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	68

O sistema imunológico formado por células e moléculas é responsável pela erradicação de patógenos e outras substâncias não próprias do organismo. Desse sistema, também faz parte a resposta imune, que envolve o reconhecimento do material estranho e a formação de uma reação para eliminar os microrganismos (Kanjwani *et al.*, 2008).

As respostas imunes são classificadas em imunidade inata e imunidade adaptativa, a imunidade inata é desenvolvida por barreiras físicas, químicas e biológicas, nas quais células especializadas e moléculas solúveis presentes em todos os indivíduos, independente do contato prévio com os agentes agressores, não muda qualitativamente ou quantitativamente após o contato (Medzhitov e Janeway, 2000).

Um processo importante na imunidade inata é a fagocitose, em que após a entrada do patógeno no corpo, tais como, vírus, bactérias ou fungos, haverá o primeiro alerta dos leucócitos do sistema imunológico inato. Como por exemplo, os monócitos imaturos que após a estimulação do antígeno migram de vasos sanguíneos para tecidos periféricos onde se diferenciam em macrófagos maduros (Van-Ginderachter *et al.*, 2006; Chaudhuri e Sabroe, 2008). Estas células destroem os microrganismos através da produção de moléculas e apresentam antígenos às células T, levando à expansão e diferenciação de linfócitos específicos contra os microrganismos invasores ou células cancerosas (Pozzi *et al.*, 2005; Preynat-Seauve *et al.*, 2006). Depois do englobamento pelos macrófagos, os microrganismos são presos, juntamente com o líquido extracelular, em um vacúolo, ou fagossomo, derivado da membrana plasmática (Flannagan *et al.*, 2009). Mudanças nos componentes presentes na membrana do fagossomo levam a geração de espécies reativas de oxigênio, que irão ajudar na degradação do microrganismo (Heyworth *et al.*, 2003).

Por outro lado, a imunidade adquirida é desenvolvida por células portadoras de receptores de antígenos com uma única especificidade, a qual é determinada por um mecanismo de rearranjo gênico durante o desenvolvimento dessas células nos seus órgãos de origem, a saber, o timo, para os linfócitos T e a medula óssea para os linfócitos B (Janeway *et al.*, 2001). Esta imunidade é dividida em humoral e celular. A imunidade humoral está envolvida na erradicação de microrganismos patogênicos presentes no sangue ou flúidos pela geração de anticorpos, que são produzidos por células B (Akira, 2011). Enquanto a imunidade celular, é responsável

pela erradicação das células cancerosas e microrganismos presentes no interior das células, e é mediada por células T citotóxicas. Tendo ainda os linfócitos T representando uma população de células-chave da imunidade adaptativa (Akira, 2011), os quais após ativação, secretam citocinas que afetam todos os outros tipos de células dentro de um ambiente local, como os macrófagos, células dendríticas (DCs) e neutrófilos (Siegmund e Zeitz, 2011).

Patologias envolvendo falhas no sistema imunológico, como por exemplo, artrite reumatóide (Schellekens *et al.*, 1998), esclerose sistêmica (Arora-Singh *et al.*, 2010) e lúpus eritematoso sistêmico (Saha *et al.*, 2011) são fontes de pesquisa científica, pois trazem grandes problemas para a população. Assim, pesquisas que buscam sanar esses problemas são importantes, com isso, as plantas medicinais têm um papel destaque, pois constituem uma grande fonte de novos compostos biologicamente ativos. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertado o interesse de vários pesquisadores (Guerra *et al.*, 2006).

A espécie *Bowdichia virgilioides*, conhecida como sucupira-preta, pertence à família Fabaceae, com ampla distribuição pelo Brasil (Almeida *et al.*, 1998). Alguns relatos comprovaram sua propriedade antimalárica (Deharo *et al.*, 2001), além de uma importante ação antinociceptiva periférica em modelos de analgesia (Silva *et al.*, 2010) e atividade anti-inflamatória (Thomazzi *et al.*, 2009), mas ainda são escassos os estudos sobre a atividade biológica dessa espécie no sistema imunológico, tornando-a um potencial objeto de estudo.

2.1 Geral

Avaliar *in vivo* os efeitos do extrato aquoso da casca do caule de *Bowdichia virgilioides* na resposta imune celular e humoral.

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade do extrato aquoso na fagocitose por macrófago;
- Avaliar o efeito do extrato na contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos;
- Avaliar os efeitos do extrato na produção de anticorpos;
- Verificar os efeitos do extrato na proliferação de linfócitos T e B;
- Avaliar atividade do extrato na produção de citocinas por linfócitos T e B.

3.1 Sistema Imunológico

O sistema imunológico formado por células e moléculas é responsável pela manutenção da homeostase do organismo, e conseqüentemente, pela erradicação de patógenos e outras substâncias não próprias. Este processo acontece através da resposta imune que envolve o reconhecimento do material estranho e a formação de uma reação para eliminá-los (Kanjwani *et al.*, 2008).

A resposta imunológica tem sido conceitualmente dividida em imunidade inata e adaptativa, sendo que a imunidade inata representa uma resposta rápida a um grande, mas limitado, número de estímulos, enquanto a imunidade adaptativa proporciona uma defesa mais versátil e um maior nível de proteção diante de novas infecções pelo mesmo agente, do que a resposta inata (Janeway *et al.*, 2001).

A imunidade inata é desenvolvida por barreiras físicas, químicas e biológicas, nas quais células especializadas e moléculas solúveis presentes em todos os indivíduos, independente do contato prévio com os agentes agressores, não muda qualitativamente ou quantitativamente após o contato (Medzhitov e Janeway, 2000). Por outro lado, a imunidade adquirida é desenvolvida por células, que são portadoras de receptores de antígenos com uma única especificidade, a qual é determinada por um mecanismo de rearranjo gênico durante o desenvolvimento dessas células nos seus órgãos de origem, a saber, o timo, para os linfócitos T e a medula óssea para os linfócitos B (Janeway *et al.*, 2001).

Células-tronco pluripotentes da medula óssea dão origem a células progenitoras mielóides e linfóides. Os progenitores linfóides, por sua vez, dão origem aos linfócitos T, B e células *natural killer* (NK). As células que se diferenciarão em linfócitos T saem da medula óssea e migram para o timo como células progenitoras, onde os processos de seleção, maturação e diferenciação ocorrem, sendo liberados apenas linfócitos T maduros, que após entrarem na circulação sanguínea migram para os órgãos linfóides secundários. Enquanto as células que se diferenciarão em linfócitos B, permanecem na medula óssea e, ao final do estágio de maturação, assim como acontece com os linfócitos T, deixam o órgão de origem e migram para os órgãos linfóides secundários (Júnior *et al.*, 2010). A migração de ambos os linfócitos acontece em função do patrulhamento dos tecidos, onde circulam em um sistema especializado de vasos, chamado de sistema linfático (Janeway *et al.*,

2001). Já os progenitores mielóides, através de estímulos, dividem-se e diferenciam-se para produzir pelo menos seis tipos celulares: os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos); os mastócitos, as DCs e os monócitos circulantes, esses últimos originarão os macrófagos residentes nos tecidos (Lees *et al.*, 2011).

A imunidade inata envolve um conjunto de mecanismos anatômicos inespecíficos pré-existentes, secretores, e celulares para combater a infecção. (Goodarzi *et al.*, 2007; Chaudhuri e Sabroe, 2008). Não tem especificidade ao patógeno, sendo sutilmente adaptada para controlá-lo e manter a homeostase do tecido. Esta imunidade é a primeira linha de defesa do hospedeiro, atuando para conter a infecção nos primeiros minutos à horas do desafio (Chaudhuri e Sabroe, 2008; Calbo e Garau, 2010, Shalhoub *et al.*, 2011). Sendo o sistema imune inato organizado para responder a dois principais grupos de moléculas: exógenas derivados de micróbios e as moléculas endógenas produzidas por danos aos tecidos. Esta imunidade está em contraste com a imunidade específica ou adaptativa que reage a estímulos imunológicos específicos (Bianchi, 2007).

Embora cada uma das imunidades tenha responsabilidades distintas, nenhuma é eficaz por si só e cada uma é influenciada pela outra (Goodarzi *et al.*, 2007).

3.2. Resposta Imune Inata

As principais células efetoras da imunidade inata são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK. Os três primeiros são chamados coletivamente de fagócitos, englobam e destroem os microrganismos patogênicos (Akira, 2011)

Alguns trabalhos demonstram que o sistema fagocitário mononuclear é uma família de células que compreende precursores na medula óssea, monócitos circulantes sanguíneos e macrófagos teciduais, em todos os órgãos do corpo (Hume, 2006, Robert *et al.*, 2011). Os fagócitos profissionais, tais como neutrófilos, macrófagos e DCs, são especialmente qualificados para fagocitar partículas grandes ($\geq 0,5 \mu\text{m}$), incluindo microrganismos. A internalização e posterior destruição de patógenos são fundamentais para a resposta imune inata, e promovem a

apresentação de antígenos e desenvolvimento da imunidade adaptativa (Flannagan *et al.*, 2009).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na resposta inata e na homeostase do tecido normal, dentre suas funções estão a apresentação de antígenos próprios e não-próprios após a infecção ou lesão, erradicação de patógenos, participação no processo de inflamação (Van- Ginderachter *et al.*, 2006; Gordon, 2007; Martinez *et al.*, 2008) e remoção de células apoptóticas (Flannagan *et al.*, 2011). Assim, existem duas vias de atuação: a conhecida como clássica, a qual é direcionada para ação antimicrobiana e tumoricida dos macrófagos, através da função efetora da resposta Th1 com a produção de interferon gama (IFN- γ), e a via de atuação alternativa, está relacionada com resposta Th2 e produção de interleucina 4 (IL-4), essa última associada com a supressão da ativação clássica, resposta a parasitas e tumores (Gordon e Taylor, 2005).

Os macrófagos reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) através de receptores de reconhecimento padrão (PRR). Este processo é mediado por receptores na superfície celular que reconhecem ligantes específicos na superfície dos patógenos (Hoebe e Beutler, 2004; Taylor *et al.*, 2005). Alguns destes receptores são capazes de transmitir sinais intracelulares que estimulam a fagocitose, enquanto outros receptores estão relacionados principalmente a participação da ligação ou do aumento na eficiência da internalização, dentre eles estão os receptores-Fc (Ravetch e Bolland, 2001), receptor de manose (CD206) (Ezekowitz *et al.*, 1990) e receptor Scavenger A (CD204) (Platt e Gordon, 2001). Além dos macrófagos, as células dendríticas, granulócitos, células NK e células epiteliais do sistema imune inato medeiam respostas rápidas, mas não específica depois de reconhecerem estruturas microbianas através dos PRRs (Cerutti *et al.*, 2011). A interação desses receptores com a superfície dos patógenos irá desencadear uma série de ações, dentre elas estão o recrutamento de células inflamatórias, ativação da produção de citocinas pró-inflamatórias ou antivirais e a fagocitose. Sendo assim, a fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento, bem como a síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos da imunidade inata (Cruvinel *et al.*, 2010).

A fagocitose é um processo importante na defesa do hospedeiro uma vez que, após a entrada do patógeno no corpo, como por exemplo, vírus, bactérias ou

fungos, haverá primeiro o alerta dos leucócitos do sistema imunológico inato, como por exemplo, os monócitos imaturos que após a estimulação do antígeno migram de vasos sanguíneos para tecidos periféricos onde se diferenciam em macrófagos maduros (Van-Ginderachter *et al.*, 2006; Chaudhuri e Sabroe, 2008). Depois do englobamento, os microrganismos são presos, juntamente com o líquido extracelular, em um vacúolo, ou fagossomo, derivado da membrana plasmática (Flannagan *et al.*, 2009). Mudanças nos componentes presentes na membrana do fagossomo levam a geração de espécies reativas de oxigênio, que irão ajudar na degradação do microrganismo (Heyworth *et al.*, 2003). Os macrófagos destroem os microrganismos através da produção de moléculas e apresentam antígenos às células T, levando à expansão e diferenciação de linfócitos específicos contra os microrganismos invasores ou células cancerosas (Pozzi *et al.*, 2005; Preynat-Seauve *et al.*, 2006). Assim, a fagocitose é um processo crucial na defesa do hospedeiro contra os microrganismos, fornecendo ligantes antigênicos para estimular a expansão clonal de células T e B.

Ainda nesse contexto, as DC's são células capazes de iniciar uma resposta imune por atuarem como potentes células apresentadoras de antígenos (APC's). Essas células têm um papel fundamental na ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (Mazzoni e Segal, 2004). São derivadas de células precursoras da medula óssea que migram da medula para residir em tecido linfóides, epitélios da pele, trato gastrointestinal e as vias aéreas. Em seu estado quiescente têm limitada capacidade de ativar respostas adaptativas através de células T, no entanto, elas têm a capacidade de capturar o antígeno, e em paralelo com a estimulação por padrões moleculares associados a patógenos, sofrem maturação, migram para gânglios linfáticos e apresentam antígenos, direcionando a resposta de células T de memória. (Pasare e Edzhitov, 2004; Mazzoni e Segal, 2004; Kaisho e Akira, 2006).

Ao sinal de um patógeno, muitas vezes referida como um sinal de perigo, as DC's são induzidas à maturação, que as diferenciam em APC's e ativadoras de células T. Produtos bacterianos e virais, bem como as citocinas inflamatórias e outras auto-moléculas, induzem a maturação de DC's através da interação direta com receptores de membrana específicos (Bell *et al.*, 1999). Após a maturação, as DC's apresentam antígenos fagocitados através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II para ativação de linfócitos T CD4⁺ e também apresentam eficientemente de uma maneira cruzada, material internalizado através

do MHC de classe I para a ativação de linfócitos T CD8⁺. Essa característica intrínseca das DC's fazem uma ligação entre a fagocitose e a resposta imune adaptativa (Stuart e Ezekowitz, 2005).

Os leucócitos são importantes na defesa inicial do organismo contra patógenos, entretanto, a iniciação de uma resposta inflamatória eficaz também requer a chegada de fatores humorais (complemento) através do aumento da permeabilidade capilar e o recrutamento de células especializadas para neutralizar e erradicar o patógeno. É importante notar que as respostas são, no entanto, mediadas por sinalização cooperativa que envolve uma grande quantidade de células, que trabalham em conjunto (Sabroe *et al.*, 2007; Parker *et al.*, 2007). Assim, o sistema complemento também participa da resposta imune inata, desempenhando múltiplas funções na defesa do hospedeiro, incluindo quimiotaxia, formação do complexo de ataque à membrana e opsonização (Stuart e Ezekowitz, 2008).

Além disso, diferentes citocinas são produzidas na imunidade inata as quais atuam de diferentes formas, recrutando e ativando leucócitos, como no caso do fator de necrose tumoral (TNF) e da interleucina 1 (IL-1), acentuam as atividades antimicrobianas dos fagócitos, como o interferon gama (INF- γ), e estimulam as respostas das células NK e células T, como a interleucina 12 (IL-12) (Abbas e Lichtman, 2007).

3.3 Resposta Imune Adaptativa

Como mencionado anteriormente, os mecanismos imunes inatos medeiam à primeira fase de proteção transitória contra os patógenos invasores, no entanto, mecanismos mais avançados de adaptação imunológica evitam invasões e infecções microbianas através da ativação antígeno-específica de células T e células B. As respostas imunes adaptativas são superiores a imunidade inata, pois fornecem especificidade ao patógeno e memória imunológica, o que efetivamente impede reinfecções futuras do hospedeiro em relação aos mesmos patógenos (Pancer e Cooper, 2006; Weaver *et al.*, 2007).

O reconhecimento imune adaptativo é mediado por dois tipos de receptores de antígenos: receptores de células T e receptores de células B (Medzhitov, 2007).

3.3.1 Resposta Imune Humoral

A imunidade humoral está envolvida na erradicação de microrganismos patogênicos presentes no sangue ou flúidos pela geração de anticorpos, que são produzidos por células B (Akira, 2011). As células B são um componente crítico do sistema imune adaptativo, fornecendo proteção específica e de longa duração a partir da estimulação de uma gama diversificada de patógenos. As células B são inicialmente produzidas no saco vitelino e, posteriormente, durante a vida fetal, no fígado e, finalmente, na medula óssea. As células que se diferenciarão em linfócitos B permanecem na medula óssea durante o processo de maturação (Rudin e Thompson, 1998; Abbas *et al.*, 2007).

Células B virgens ao saírem da medula óssea circulam através do sangue periférico e se dirigem aos linfonodos na zona de células T através das vênulas de endotélio alto. Se não encontrarem o antígeno (Ag), elas deixam os linfonodos através dos vasos linfáticos eferentes, recirculam entre o sangue periférico e os tecidos linfóides, entrando em apoptose dentro de alguns dias. No entanto, se encontrarem o antígeno apresentado pelas DC's em contato com células T antígeno-específicas ativas, tornam-se ativadas e migram para o centro germinativo. No centro germinativo, as células B ficam continuamente migrando entre a zona escura (centroblastos) e a zona de clara (centrócitos). Na zona escura, as células sofrem rápida proliferação, mutações somáticas das regiões IgV e recombinação ou mudança de classe do isotipo das regiões IgH; na zona clara, elas reencontram com o antígeno que levam ao direcionamento do aumento da afinidade do receptor de célula B (BCR) pelo antígeno (maturação de afinidade). Este processo resulta na sobrevivência e proliferação de clones de células B com um BCR de alta afinidade para o Ag (Allen *et al.*, 2002).

Sendo assim, a ativação de células B é iniciada após o reconhecimento do antígeno pelo BCR e resulta na proliferação e diferenciação dessas células (Kurosaki, 2010; Harwood e Batista, 2010). As moléculas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos nas células B são as imunoglobulinas de membrana IgM e IgD. Estas são a contrapartida do receptor de antígeno na célula T (TCR) e, por analogia, são chamados de receptores de células B (BCR) (Júnior *et al.*, 2010). As células B também têm receptores tipo Toll (TLRs), que lhes permitem responder a PAMPs, tais como lipopolissacarídeo (LPS) (Arranz *et al.*, 2010). Com isso, essas

células são capazes de reconhecer e responder a antígenos solúveis, além de reconhecerem o antígeno na superfície de células apresentadoras de antígenos, tais como DC's (Wykes *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2005), células dendríticas foliculares (Mandel *et al.*, 1980) e macrófagos (Koppel *et al.*, 2005).

Após encontrar o antígeno, as células B são ativadas e se diferenciam em células B de memória ou células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas, esses processos dinâmicos ocorrem no centro germinativo e nas áreas extrafoliculares dos linfonodos (Kurosaki, 2010). Uma vez que as células B reconhecem seus antígenos-alvo no baço ou gânglios linfáticos, tornam-se ativadas e iniciam uma série de reações, incluindo a formação de centro germinativo e recombinação de mudança de classe, resultando na produção de imunoglobulinas (Igs) antígenos-específicas (Wardemann *et al.*, 2003). Cada molécula Ig é constituída por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas por pontes dissulfeto. Existem cinco tipos de cadeias pesadas, chamado α , γ , δ , ϵ e μ , que definem as classes de imunoglobulinas, IgA, IgG, IgD, IgE e IgM. Existem dois tipos de cadeias leves, kappa (κ) e lambda (λ). A especificidade da ligação ao antígeno é definida pela fração variável (Fab) da molécula, constituída pela união das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas (Rudin e Thompson, 1998; Abbas *et al.*, 2007). O processo combinatório dos diferentes segmentos que constituem as porções variáveis das cadeias leves e pesadas e as diferentes possibilidades de associação entre elas resultará em aproximadamente 10 diferentes especificidades de reconhecimento pelas imunoglobulinas (Mizoguchi e Bhan, 2006). Após a produção de anticorpos altamente específicos durante infecções microbianas ou doenças auto-imunes por células B ativadas, esses anticorpos recrutam células efetoras imunes inatas, que expressam abundantemente receptores de superfície celular específico para diferentes fragmentos terminais COOH da molécula do anticorpo, conhecidos por fração cristalizável (Fc). Esses receptores Fc fazem uma ligação entre a especificidade do sistema imune humoral e as funções efetoras fornecidas pelas células do sistema imunológico inato, como mastócitos, monócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos. (Takai, 2002; Hogarth, 2002; Nimmerjahn e Ravetch, 2008).

Além disso, os linfócitos B também atuam como células apresentadoras de antígenos, após a internalização e processamento do antígeno ligado ao BCR. Os peptídeos gerados por processamento de antígenos são expressos na membrana do

linfócito B através das moléculas MHC classe II, e apresentado ao linfócito T CD4⁺. A interação entre o complexo peptídeo/MHC classe II com o TCR inicia uma cadeia de eventos que levam o linfócito T auxiliar à expansão clonal e produção de citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação dos linfócitos B. A produção de citocinas por células B, no entanto, precisa ser distinguido como "primária" ou "secundária", sendo a produção primária a provocada por estímulos primários, como TLR, enquanto a produção secundária requer a interação de células B ativadas com células T auxiliares ativadas (Gray *et al.*, 2007).

A taxa de eliminação de um agente patogênico é de fundamental importância para o hospedeiro e determina a extensão e as conseqüências da infecção. A produção de anticorpos, juntamente com a atividade de outras células do sistema imunitário, desempenha um papel importante no início e final da resposta e contribuem para a contenção e eliminação do microrganismo patogênico (Martin e Kearney, 2000). Apesar de sua importância, os anticorpos têm uma vida limitada, com isso, uma população saudável de células plasmáticas é necessária, independentemente de existirem estímulos de patógenos específicos para gerar nova memória e células plasmáticas (Dunn-Walters e Ademokun, 2010). Células B de memória não secretam anticorpos constitutivamente, exigindo reestimulação antes que eles possam contribuir para a respostas humorais (Kurosaki, 2010). Um número constante de anticorpos circulantes com um ampla gama de especificidade é um requisito essencial como uma primeira linha de defesa, sua atividade opsonizadora é um elo de ligação vital entre os sistemas imune inato e adaptativo (Dunn-Walters e Ademokun, 2010).

Recentemente tem sido descrita uma subpopulação de células B (CD1d^{hi}CD5⁺B10) funcionalmente importante que pode regular negativamente a respostas imunes em modelos de camundongos com inflamação e autoimunidade. Essas células exercem seu papel regulatório através da produção de IL-10, e, além de terem sido predominantemente identificadas em diversos modelos de doenças autoimunes, foram demonstradas inclusive inibindo a proliferação de células T e a resposta inflamatória T-dependente *in vivo* (Bouaziz *et al.*, 2008).

3.3.2 Resposta Imune Celular

Os linfócitos T representam uma população de células-chave da imunidade adaptativa, sendo ativadas quando antígenos são apresentados por células apresentadoras de antígenos, como exemplo, por DCs ativadas (Akira, 2011). Após sua ativação, as células T secretam citocinas que afetam todos os outros tipos de células dentro de um ambiente local, como os macrófagos, DCs e neutrófilos (Siegmond e Zeitz, 2011). Além disso, a imunidade celular mediada por células T citotóxicas é responsável pela erradicação de células cancerosas e microrganismos presentes no interior das células (Akira, 2011), cujos receptores reconhecem especificamente as proteínas virais produzidas na célula infectada em associação com MHC de classe I do hospedeiro (Howard *et al.*, 1992).

Quando as células T auxiliares virgens encontram o antígeno pela primeira vez, se diferenciam em células Th1 ou Th2 que produzem um padrão específico de citocinas (Avni e Rao, 2000).

Respostas imunes mediadas por células Th1 são normalmente vistas em resposta a um patógeno intracelular apresentado por uma célula apresentadora de antígeno na presença de interleucina 12 (IL-12). Uma resposta imune é formada para que o agente infeccioso seja localizado, além disso haverá a secreção de fatores que promovem a apoptose da célula infectada, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α); além disso, haverá a indução na diferenciação de linfócitos T virgens em células T citotóxicas (Siegmond e Zeitz, 2011).

Por outro lado, as células da linhagem Th2, atuam na eliminação de microrganismos causadores de infecções parasitárias (helmintos), e são caracterizadas pela produção de interleucina-4 (IL-4), IL-5 e IL-13, que são potentes ativadores de células B para produção de imunoglobulinas do tipo IgE, recrutamento de eosinófilos e mecanismos relacionados a expulsão de microrganismos da mucosa, como por exemplo, a produção de muco e hipermotilidade (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005).

Recentemente, um subconjunto de células Th adicional foi descrito, chamadas Th17. Essas células Th17 parecem ter evoluído como um braço do sistema imune adaptativo, especializadas para proteção aprimorada do hospedeiro contra bactérias extracelulares e alguns fungos, microrganismos provavelmente não combatidos pela imunidade Th1 ou Th2, havendo uma evolução para melhorar a

erradicação de patógenos intracelulares e helmintos, respectivamente (Weaver *et al.*, 2007).

3.4 Citocinas

As citocinas são um importante grupo de proteínas que funcionam como comunicadores intercelulares, que medeiam as respostas inatas e adaptativas. São produzidas por diversos tipos celulares e geralmente agem localmente através da interação com receptores específicos na superfície das células que as produziram (ação autócrina) ou em outros tipos de células (ação parácrina). No sistema imunológico, uma grande variedade de citocinas desempenham papéis importantes tanto no desenvolvimento de um sistema imunológico funcional, como na resposta do organismo à infecção (Holloway e Shannon, 2001). Dentre as citocinas produzidas pode-se citar a IL-2, produzida por células T CD4+ e CD8 + ativadas, esta última, em menor quantidade. Além dessas células, DCs ativadas e NK também produzem esta citocina. Dentre suas funções estão, a ativação e proliferação de células T, B e das células NK (Abbas *et al.*, 2007 ;Malek, 2008).

Da mesma forma, a IL-12 é uma importante citocina produzida pelos monócitos e macrófagos, necessária para o desenvolvimento da resposta imune tipo Th1, e um potente indutor da produção de IFN- γ a partir de células T. A expressão de IL-12 em macrófagos é induzida pela exposição ao LPS e outros produtos microbianos (Gately, 1998).

Outra citocina produzido principalmente por células do sistema imune inato, incluindo monócitos/macrófagos, células NK, mastócitos e neutrófilos é o TNF (Mariscalco, 2006). O TNF- α participa na defesa do hospedeiro contra patógenos, e modula a resposta imune por ativar a produção de outras citocinas regulatórias como IL-1, IL- 6, IFNs, fatores de crescimento e fatores estimuladores de colônia de granulócito e monócitos (Hong *et al.*, 2005).

Igualmente importantes são os interferons, os quais são uma família de citocinas que executam funções fundamentais na protecção dos organismos hospedeiros e na manutenção da homeostase (Hertzog *et al.*, 2011). O IFN- γ estimula diversas funções, como por exemplo, ações antitumorais, atividade

antimicrobial, aumento na destruição de patógenos intracelular e o processamento e apresentação de antígenos a linfócitos através da indução do MHC de classe II (Gessani e Belardelli, 1998).

Por outro lado, a IL-4 é uma citocina que desempenha importante papel no desenvolvimento da natureza da resposta imune, dentre estas, as dirigidas às células Th2. As células T virgens liberam IL-4 que atua como principal fator de crescimento autócrino para a expansão e ativação das células Th2 as quais secretam IL-4, IL-5 e IL-6. As citocinas Th2 inibem o desenvolvimento das células Th1 e, conseqüentemente, as respostas imunes mediadas por células (Alfano e Poli, 2005). Além disso, essa citocina tem ação na produção de anticorpo, hematopoiese, inflamação e na proliferação e diferenciação de células B ativadas. Sobre células B ativadas, IL-4 aumenta a expressão de IgG1 e IgE (Hong *et al.*, 2005).

Quanto a interleucina 10 (IL-10), é uma citocina secretada principalmente pelas DC's e células Th2. Inibe a produção das citocinas proinflamatórias, quimiocinas e a expressão de moléculas co-estimulatórias de DC's e, por isso, inibe a ativação das células T (Alfano e Poli, 2005). Diferentemente de sua função supressora, a IL-10 é um fator estimulante para maturação das células B em células produtoras de anticorpos (Mauri e Bosma, 2012). Uma regulação negativa da resposta imune por citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 é crucial para o equilíbrio do sistema imunológico (Dunn-Walters e Ademokun, 2010).

3.5 Produtos Naturais

Sabendo-se da importância do sistema imunológico na manutenção da homeostasia do organismo e no combate as infecções causadas pelos microrganismos, a ação de produtos naturais nesse sistema ainda é pouco explorada. Assim, trabalhos que busquem esclarecer o uso de produtos naturais com o intuito de modular esse sistema, são importantes para a obtenção de novos conhecimentos e fundamentação científica do uso popular dos produtos naturais.

Durante séculos a raça humana tem construído dispositivos para resolver problemas e criar produtos para as suas necessidades. Com um número estimado em mais de 300.000 espécies de plantas e, provavelmente, perto de dois milhões de espécies de fungos, insetos e vários organismos marinhos, a natureza continua a

ser um reservatório incomparável de diversidade biológica e química. Entretanto, a maioria da biodiversidade ainda é inexplorada (Bohlin *et al.*, 2010). Abundantes na flora, as plantas usadas para fins medicinais destacaram-se como importante conjunto de elementos utilizados para a cura dos males do corpo e do espírito (Santos e Antônio, 2008).

Interesses em plantas medicinais tem aflorado devido ao aumento da eficiência de novas drogas derivadas de plantas e o crescente interesse em produtos naturais. Devido às preocupações sobre os efeitos colaterais da medicina convencional e o custo elevado na aquisição de produtos sintéticos, o uso de produtos naturais como alternativa ao tratamento convencional na cura de várias doenças tem aumentado nas últimas décadas (Fong 2002; Dattner 2003). Assim, as plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado da saúde constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertado o interesse de vários pesquisadores. Sendo assim, as plantas medicinais têm se mostrado uma alternativa terapêutica viável para várias patologias, inclusive o estudo da ação desses vegetais no sistema imunológico.

Um grande número destas plantas e seus constituintes isolados têm demonstrado efeitos terapêuticos benéficos, incluindo efeito anti-oxidante, anti-inflamatório, efeitos anti-câncer, antimicrobiano e imunomoduladores. Em relação à resposta imune, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com uma vasta variedade de espécie de plantas (Choo *et al.*, 2003; Lee & Choi, 2006; Zakaria *et al.*, 2006; Barreiro *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2010).

Entre as substâncias oriundas de plantas de importância atual, pode-se mencionar a forskolina, obtida de *Coleus barbatius*, que apresenta promissores efeitos contra asma e tumores, a artemisinina, presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica e imunossupressora, e o diterpeno, anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que se encontra disponível no mercado farmacêutico, constituindo-se uma grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões (Cechinel-Filho e Yunes, 1998; Wang *et al.*, 2007).

De modo interessante, foi demonstrado que, extrato aquoso de *Cassia occidentalis* L. (Fabaceae), apresenta efeitos supressivos sobre peso e celularidade em órgãos linfóides de camundongos (Bin-Hafeez *et al.*, 2001). Em contraste, extrato

aquoso de *Trigonella foenum graecum* L. (Leguminosae), aumenta o peso do timo e o número de tímócitos (Bin-Hafeez *et al.*, 2003). De mesmo modo, o extrato de *Epimedium alpinum* (Berberidaceae) demonstrou efeito estimulatório na proliferação de tímócitos e produção de IL-2 (Kovacević *et al.*, 2006). Recentes investigações demonstraram que extrato aquoso de *Asparagus racemosus* (Liliaceae) ativa a resposta imune humoral e celular, com aumento significativo de citocinas Th1 (IL-2 e INF- γ) e Th2 (IL-4) (Gautam *et al.*, 2009) e Mukherjee e colaboradores (2010) demonstraram que o extrato das sementes de *Nelumbo nucifera* (Nymphaeaceae) foi capaz de alterar a contagem total e diferencial de leucócitos, potencializou o efeito sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardia e a fagocitose.

Desta forma, estes dados revelam a potencialidade imunomoduladora de substâncias oriundas de espécies vegetais e que a abordagem etnofarmacológica tem sido uma plataforma atual para programas de pesquisa com o objetivo de estudar as plantas usadas na medicina tradicional em diferentes culturas (Bohlin *et al.*, 2010).

3.5.1 *Bowdichia virgilioides*

Apesar de popular no nordeste brasileiro, ainda são poucos os estudos científicos sobre a atividade biológica da *Bowdichia virgilioides*. Dados da literatura mostram sua propriedade antimalárica (Deharo *et al.*, 2001), além de uma atividade anti-inflamatória (Thomazzi *et al.*, 2009), atividade anti-hiperglicemiante significativa em ratos normoglicêmicos (Souza *et al.*, 2009), uma importante ação antinociceptiva periférica em modelos de analgesia (Silva *et al.*, 2010) e efeito anti-inflamatório da casca do caule (Barros *et al.*, 2010). Na medicina popular, o extrato de suas sementes é usado para o tratamento do reumatismo, artrite e doenças na pele, assim como, sua casca é usada como antidiabética, cicatrizante e no tratamento tópico de inflamações (Albuquerque *et al.*, 2007).

Assim, a partir de uma abordagem etnofarmacológica, foi selecionada a espécie *Bowdichia virgilioides* como objeto de estudo, sendo esta planta uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae, que é a terceira maior família de plantas com flores (Poth *et al.*, 2011). É uma das maiores famílias botânicas com

cerca de 750 gêneros e mais de 18.000 espécies (Wink, 2003), conhecida popularmente como sucupira-preta (Almeida *et al.*, 1998).

Esta planta é comumente encontrada nas terras baixas secas da Amazônia da Bolívia, tem ampla distribuição pelo Brasil, além de estar presente no norte da América Central, além disso, é nativa, não é endêmica do Brasil, tem distribuição geográfica no Brasil nos estados do norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul e tem como domínios fitogeográficos a amazônia, caatinga, cerrado, mata atlântica e pantanal (Brandão *et al.*, 1992). A *Bowdichia* apresenta 3 espécies distintas, a *Bowdichia kuhlmanii* Ducke, a *Bowdichia nitida* Spruce ex Benth. e a *Bowdichia virgilioides* Kunth (Lima, 2011). A maioria dos membros dessa família têm flores que são caracterizadas por um único eixo de simetria (Figura 1) (Citerne *et al.*, 2006).

Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies pertencentes a este gênero têm demonstrado a ocorrência de muitas classes de constituintes, incluindo terpenóides, flavonóides e alcalóides (Arriaga *et al.*, 2000; Juck *et al.*, 2006). Em relação à família Fabaceae, existem dados na literatura que demonstram algumas espécies com efeitos biologicamente diversificados, como exemplo uma atividade anti-helmíntica da espécie *Flemingia vestita* demonstrada por Das e colaboradores (2004); além disso, foi demonstrado por Carvalho e colaboradores (2009), que o extrato aquoso de *Erythrina velutina* Willd produz resposta contrátil do íleo de cobaia. Investigação de Atsamo e colaboradores (2011) demonstrou que o extrato aquoso da casca do caule de *Erythrina senegalensis* pode ser considerado seguro em relação à toxicidade; e por fim, estudo feito por Taur e Patil (2011), demonstrou que o extrato etanólico das raízes *Clitoria ternatea* pode ser útil no tratamento da asma.

Tomando por base os dados da literatura que demonstram indiretamente a ação da própria *Bowdichia virgilioides* no sistema imune, assim como, de espécies pertencentes a sua família, foram desenvolvidos estudos para avaliação da ação dessa planta sobre diversos parâmetros de modulação do sistema imunológico.

Figura 1. *Bowdichia virgilioides* Kunth (Fabaceae).



Fonte: http://www.fiocruz.br/ccs/media/hcsm_sucupira2

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (18-25 g) machos mantidos em ciclo claro e escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água, sendo fornecidos pelo Biotério Central da UFAL. Todos os procedimentos realizados durante o desenvolvimento do trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFAL (Processo 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 °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 *Bowdichia virgilioides*

Os camundongos *Swiss*, oito animais por grupo, foram tratados por via oral com placebo (200 µL PBS) ou com extrato aquoso da *B. virgilioides* (EaBv) nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg e 200 mg/kg diluído em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), uma vez por dia, por 7 dias consecutivos. Os animais

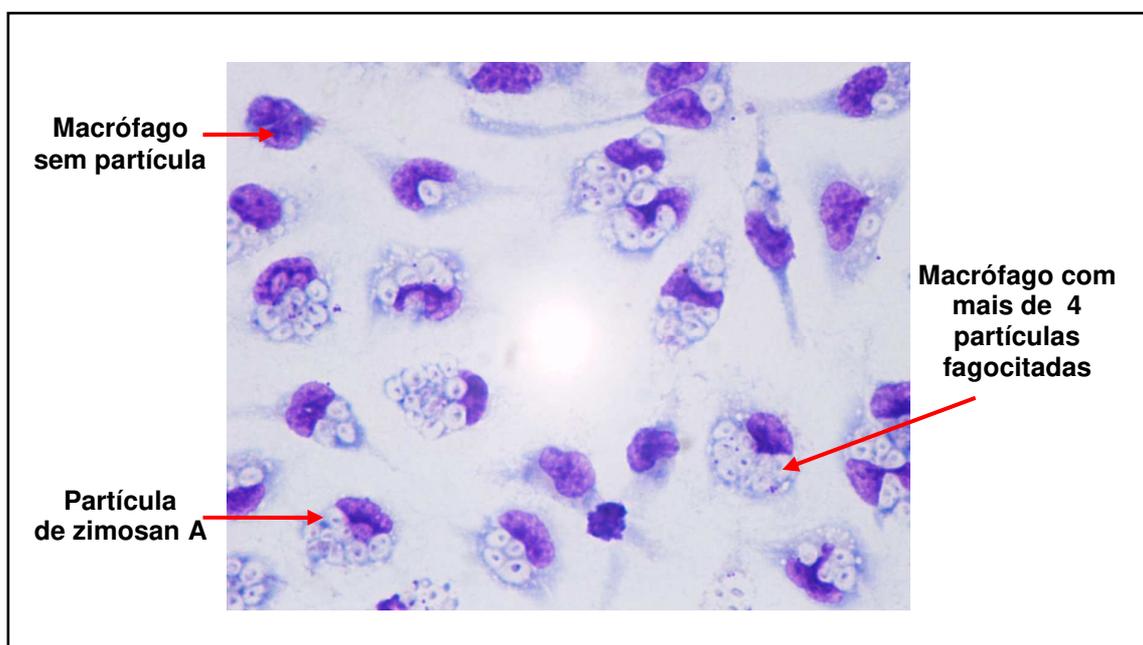
foram eutanasiados após 24 h do último tratamento e os experimentos foram realizados.

4.5 Ensaio de Fagocitose

A presente metodologia foi realizada de acordo com os protocolos utilizados por Bos e Souza (2000) e Batista e colaboradores (2006), com algumas modificações. Os animais foram divididos randomicamente em quatro grupos e após o período de tratamento, os macrófagos peritoneais foram coletados. Para a coleta dos macrófagos peritoneais residentes, os camundongos foram eutanasiados, presos em um suporte de isopor onde, com auxílio de pinça e tesoura, a pele da região ventral foi removida e o peritônio exposto. Após essa exposição, com uma seringa de 10 mL e agulhas estéreis, foram injetados na cavidade peritoneal do animal 8 mL PBS, gelado e estéril, com cuidado para não romper nenhuma víscera. Em seguida, com uma gaze estéril, foram dadas leves batidas na lateral do abdomen, para que a solução salina no interior da cavidade fosse agitada e os macrófagos presos a membrana peritoneal fossem soltos, a partir daí, foram retirados aproximadamente 8 mL do lavado peritoneal e transferido para um tubo de 15 mL, estéril, que foi colocado no gelo para impedir a aderência das células a parede interna do tubo e para que as células continuassem viáveis. Posteriormente os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada por 10 minutos, 1500 rpm a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* de células foi re-suspenso em 2 mL de meio de cultura RPMI 1640 a 10% de soro bovino fetal (SBF), as células foram homogeneizadas e retirada uma alíquota de 10 µL para a contagem em câmara de Neubauer. Em uma placa de 24 poços foram colocadas lamínulas redondas de vidro estéreis e adicionado 5×10^5 células em meio RPMI a 10% de SBF por poço, em seguida levadas para estufa a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, onde ficaram aderindo por duas horas. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS por 2 vezes para que as células não aderentes fossem retiradas e apenas ficassem os macrófagos aderentes às lamínulas. A fagocitose foi realizada utilizando 50 µg/mL de zimosan A (parede de *Saccharomyces cerevisiae*), em 300 µL de meio de cultura RPMI por poço. A

fagocitose das partículas foi permitida por 2 horas e, após, os poços foram lavados 2 vezes com PBS e, em seguida, as culturas foram fixadas com metanol absoluto por 10 minutos e coradas pelo método de Giemsa. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas dos poços, montadas em lâminas histológicas e examinadas ao microscópio óptico Nikon Eclipse 50i no aumento de 100x com óleo de imersão. Foram contadas 100 células por lamínulas por grupo, em que foi determinado o número de células que fagocitaram e o número de células que fagocitaram mais que 4 partículas de zimosan A (Figura 2). Esses números foram expressos como porcentagem de fagocitose e capacidade fagocítica (CF= nº de células que fagocitaram mais que 4 partículas/100), respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes. A figura 2 representa macrófagos peritoneais residentes estimulados por zimosan A.

Figura 2. Macrófagos peritoneais residentes estimulados por zimosan A (*Saccharomyces cerevisiae*).



Fotomicrografia representando macrófagos peritoneais em cultura. Aumento de 100x usando óleo de imersão.

Fonte: Autor dessa dissertação, 2012.

4.6 Contagem Total e Diferencial de Leucócitos do Sangue Periférico

Método utilizado de acordo com o protocolo descrito por Mukherjee e colaboradores (2010). Após o término do tratamento foram coletados 5 μ L de sangue periférico da cauda do animal e diluído em 295 μ L de líquido de Turk para lise das hemácias. Posteriormente 10 μ L dessa mistura colocada em câmara de Neubauer e feita à contagem de leucócitos totais. A contagem diferencial de leucócitos foi feita através da confecção de lâminas hematológicas. Foi colocada uma gota do sangue periférico em uma lâmina e feito esfregaço sanguíneo. Após secagem desse esfregaço a temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com o Panótico rápido (LB). Esse corante é composto por três reagentes, a solução de triarilmetano a 0,1% (solução 1); solução de xantenos a 0,1% (solução 2) e a solução de tiazinas a 0,1% (solução 3). Após secagem, a lâmina foi submergida na solução 1 mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo ou para os lados durante 5 segundos, deixando escorrer bem. Em seguida, a lâmina foi submergida na solução 2 da mesma maneira que a anterior e por último na solução 3. Finalmente a lâmina foi lavada com água destilada e o esfregaço foi seco ao ar na posição vertical. A contagem diferencial de células foi feita em microscopia óptica, foram contadas 100 células e dessas foram feitas as diferenciações dos leucócitos entre: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. A contagem diferencial foi realizada no aumento de 100x, utilizando-se o óleo de imersão.

4.7 Ensaio de Hemaglutinação

Ensaio feito de acordo com protocolo descrito por Mungantiwar e colaboradores (1999) e Bin-Hafeez e colaboradores (2001), com algumas modificações. Os animais foram tratados com EaBv, por via oral, uma vez por dia, 7 dias consecutivos e no dia seguinte imunizados com uma injeção intraperitoneal de 100 μ L hemácia de carneiro (HC) a 10% e, no grupo controle negativo, não imunizados (NI), 100 μ L de salina. Sendo assim, no 8º dia após a imunização, os animais foram anestesiados com uma associação de Ketamina/Xilazina e foi feita a coleta do sangue no plexo retro-orbital e após centrifugação foi obtido o soro. Para o ensaio de hemaglutinação, foi feita a diluição seriada do soro dos animais em placa

de 96 poços, onde foram colocados em todos os poços 25 µL de PBS e em seguida no primeiro poço foi adicionado mais 25 µL do soro dos animais, assim feita diluição seriada até uma diluição final de 1:1024. Posteriormente foi colocado em cada poço 20 µL de hemácia de carneiro a 1%, as placas foram deixadas a temperatura ambiente por 2 horas e em seguida foi feita a leitura da placa. A titulação de anticorpos foi dada de acordo com a última diluição que apresentou hemaglutinação, ou seja, a maior diluição que apresentou a formação de uma “poeira” no poço, considerada assim reagente para a hemaglutinação. Foi considerado não-reagente aquele poço onde se formou em seu fundo um botão de hemácia, não havendo formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo nesses poços. A representação dos resultados foi feita de acordo com protocolo descrito por Puri e colaboradores (1994) e Mahajan e Mehta (2010), sendo feito um ranking de acordo com a presença da hemaglutinação, sendo a diluição de 1/2 considerada como 1, a diluição de 1/4 considerada 2 e assim sucessivamente.

4.8 Proliferação de Linfócitos T e B

Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo presente no trabalho de Gao e colaboradores (2008). Após obtenção dos linfonodos mesentéricos dos animais tratados, esses órgãos foram macerados em 1 mL de PBS a 5% SBF para obtenção dos linfócitos. As células coletadas foram re-suspensas em meio RPMI a 10% de SBF e adicionadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^6 células por poço, o plaqueamento foi feito em triplicata e de acordo com o tratamento. Foi utilizado como controle positivo da proliferação a Concanavalina A (ConA) (4 µg/mL), mitógeno para linfócitos T, ou Lipopolissacarídeo (LPS) (2 µg/mL), mitógeno para linfócitos B. Em seguida, as placas foram levadas para estufa úmida a 37°C e 5% de CO² por um período de 48 horas. Após este período, a solução de (3 - (4,5-dimetil-2-il) -2,5-brometo de difeniltertrazolim) (MTT) (5 mg/mL) foi adicionada e a placa de cultura foi incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionou-se o dimetilsulfóxido, solução solubilizante do MTT, e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Nos experimentos delineados com o objetivo de avaliar os efeitos do EaBv frente a mitógenos, as células foram adicionadas em placas de 96 poços na densidade de 10^6 células por poço, o plaqueamento foi feito em triplicata e de acordo

com o tratamento. Em seguida, foram adicionados a ConA (4 µg/mL) ou LPS (2 µg/mL). As placas foram levadas para estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ por um período de 48 horas. Após este período, a solução de (3-(4,5-dimetil-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolim (MTT) (5 mg/mL) foi adicionada e a placa de cultura foi incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionou-se o dimetilsulfóxido, solução solubilizante do MTT, e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

4.9 Análise por Citometria de Fluxo

Foram realizadas análises por citometria de fluxo para determinar o fenótipo dos linfócitos quanto à expressão das moléculas CD3 e B220/CD45R na superfície dessas células e quanto à expressão intracelular de citocinas. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD3 marcados com APC (*allophycocyanin*) para identificar linfócitos T, anti-B220/CD45R acoplado a PE (*phycoerythrin*) para identificar linfócitos B e anticorpos anti-TNF-α e IL-10 marcados com FITC (*fluorescein isothiocyanate*) para avaliar a expressão intracelular das citocinas. O controle negativo para análise foi feito com anticorpos primários de imunoglobulinas não relacionadas, que não geram marcação significativa.

Para tanto, os linfócitos provenientes dos linfonodos mesentéricos dos animais após os tratamentos, foram colocados em placas de 96 poços de fundo “U”, em uma densidade de 2×10^6 células/poço, após serem lavados com PBS e centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, as células foram incubadas com anticorpo CD3 e anticorpo B220, por 20 minutos, a 4°C, no escuro. Após a devida incubação, as células foram lavadas com PBS. A seguir, para realizar a marcação intracelular das citocinas as células foram fixadas e permeabilizadas conforme recomendações do produto BD *Cytofix/Cytoperm* e incubadas com anticorpos anti-TNF-α e anti-IL-10. As leituras foram feitas em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD) e os dados obtidos foram analisados através do software WinMDI versão 2.9.

4.10 Análise Estatística

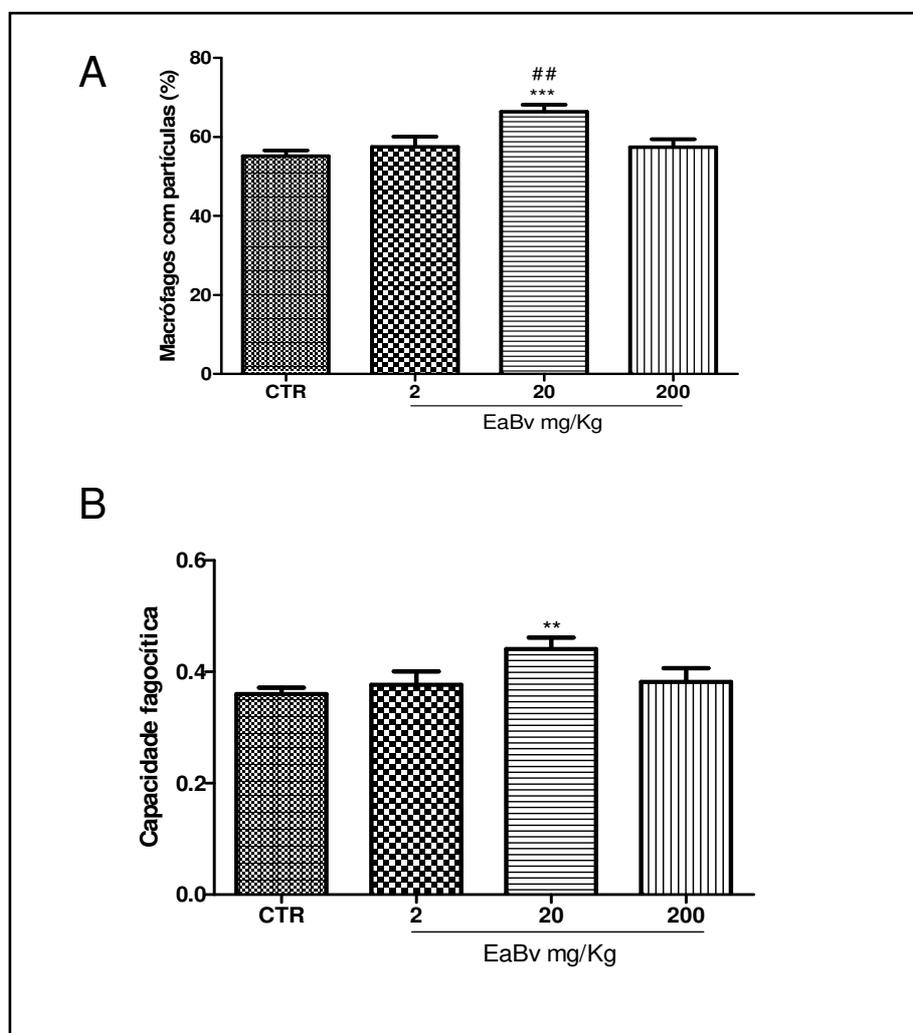
Os resultados foram analisados através do *One-Way* ANOVA seguido do teste de Newmann-Keuls. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), com um nível de significância selecionado para $p < 0.05$. Para as análises e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador *GraphPad Prism* versão 5.00 (GraphPad Prism Software, Inc.).

5.1 Efeito do Extrato Aquoso da *Bowdichia virgilioides* na Atividade Fagocítica de Macrófagos Peritoneais.

Para avaliar o efeito do EaBv na fagocitose total e na capacidade fagocítica, os macrófagos peritoneais foram obtidos dos animais após os tratamentos nas doses de 2 , 20 e 200 mg/kg e o grupo controle.

Nessas condições foi demonstrado que os animais tratados com EaBv na dose de 20 mg/kg apresentaram um aumento na porcentagem de macrófagos que fagocitaram partículas de zimosan A, este aumento ocorreu quando comparado ao grupo controle e também quando comparado aos tratamentos de 2 e 200 mg/kg (Figura 3A). Em relação à capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais foi observado um aumento na dose de 20 mg/kg, quando comparado ao grupo controle (Figura 3B). Entretanto, nas doses de 2 e 200 mg/kg não foram observadas alterações no número total de células fagocíticas, como também na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais quando comparados ao grupo controle (Figuras 3A e 3B).

Figura 3. Capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais obtidos de animais tratados com extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides*.



Animais foram tratados por via oral com EaBv por sete dias consecutivos, uma vez por dia, nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg, 200 mg/kg. Células dos animais tratados com salina foram utilizadas como controle (CTR). Após tratamento, foi feito o ensaio de fagocitose com zimosan A. Em **A** está expresso o número percentual médio de macrófagos que fagocitaram as partículas de zimosan A, enquanto que em **B** representa a média da capacidade fagocítica dos macrófagos após estímulo com zimosan A. Os dados estão representados pela média \pm EPM de 3 experimentos em triplicata. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido com o teste de Newmann-Keuls. (***) $p \leq 0,001$ e (**) $p \leq 0,01$ em relação ao controle. (##) $p \leq 0,01$ em relação às doses de 2 mg/Kg e 200 mg/Kg.

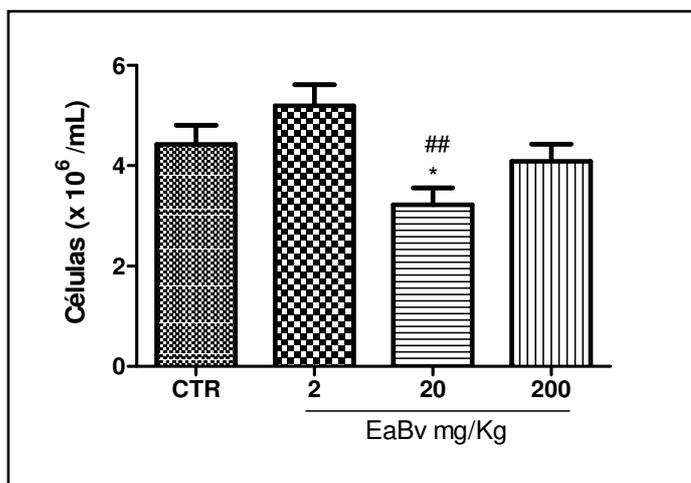
Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.2 Efeito do Extrato Aquoso da *Bowdichia virgilioides* sobre Leucócitos Sanguíneos.

Buscando avaliar o efeito da EaBv sobre os leucócitos no sangue periférico foi realizada a contagem total e diferencial destas células.

Assim, como resultado, a figura 4 mostra que a dose de 20 mg/kg foi capaz de diminuir o número total de leucócitos sanguíneos, quando comparado ao controle, como também, quando comparado a dose de 2 mg/kg. Entretanto, em relação às doses de 2 e 200 mg/kg não houve diferença no número total de leucócitos, quando comparados ao grupo controle.

Figura 4. Efeito do extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* no número total de leucócitos sanguíneos.



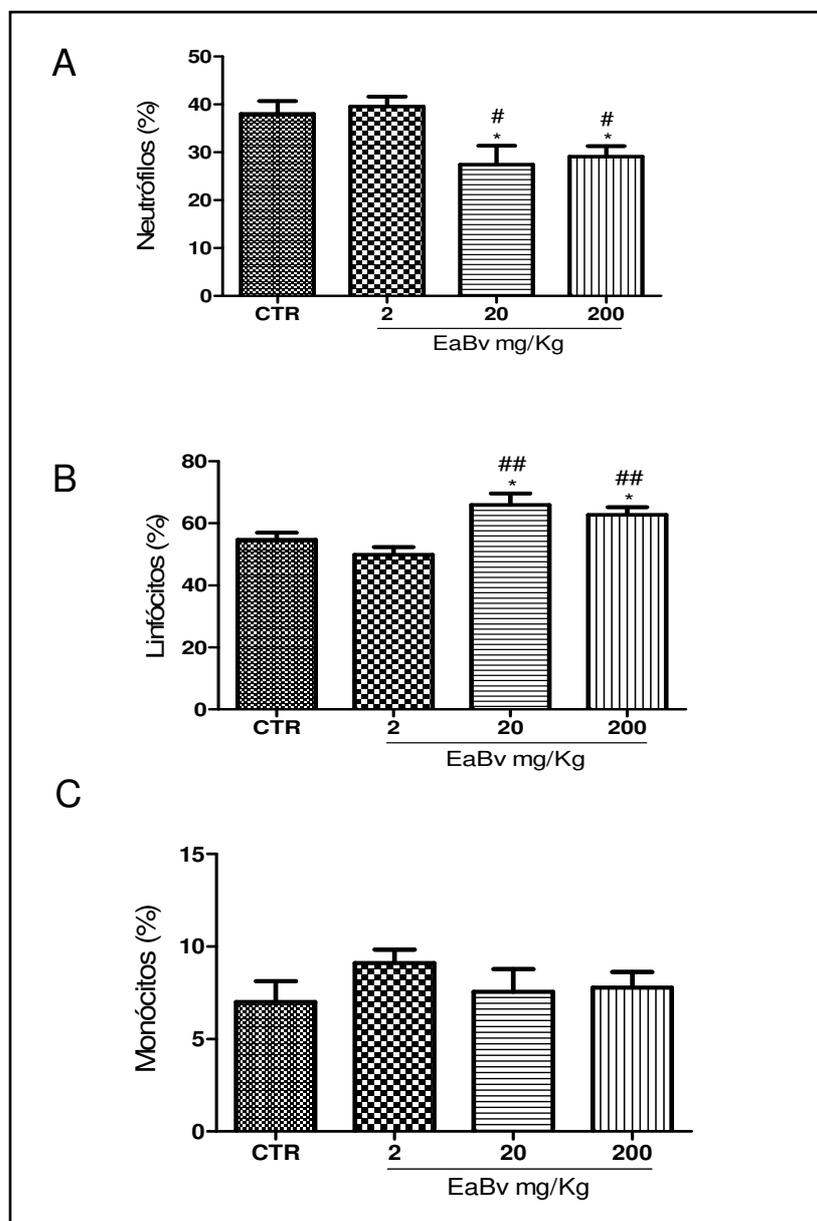
Animais tratados por via oral com o EaBv por sete dias consecutivos, uma vez por dia, nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg, 200 mg/kg e o grupo controle (CTR) tratado com salina. Os dados estão representados pela média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido com o teste de Newmann-Keuls. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle. (##) $p \leq 0,01$ em relação à dose de 2 mg/kg.

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Em relação à contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico, os resultados demonstraram que o EaBv nas doses de 20 e 200 mg/kg foram capazes

de diminuir o número de neutrófilos, quando comparado aos grupos controle e a dose de 2 mg/kg (Figura 5A). Em relação aos linfócitos, as doses de 20 e 200 mg/kg foram capazes de aumentar o número dessas células quando comparados ao grupo controle e ao grupo com dose de 2 mg/kg (Figura 5B), no entanto, o EaBv não foi capaz de alterar o número de monócitos (Figura 5C). Não foi observada a presença de eosinófilos e basófilos em nenhum dos grupos analisados.

Figura 5. Efeito do extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* na contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico.



Animais tratados por via oral com EaBv por sete dias consecutivos, uma vez por dia, nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg, 200 mg/kg e o grupo controle (CTR) tratado com salina. Retirada do sangue periférico, foi feita a contagem diferencial de leucócitos num total de 100 células. Em **A**, está expresso o número de neutrófilos, em **B** o número de linfócitos e em **C** o número de monócitos. Os dados estão representados pela média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido com o teste de Newmann-Keuls. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle. (#) $p \leq 0,05$ e (##) $p \leq 0,01$ em relação à dose de 2 mg/kg.

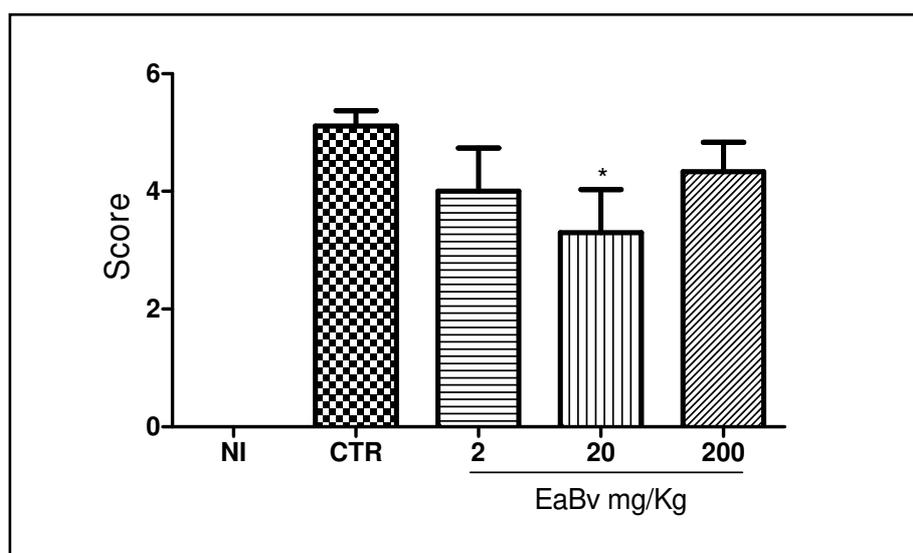
Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.3 Efeito do Extrato Aquoso da *Bowdichia virgilioides* na Produção de Anticorpos.

Com o propósito de avaliar a ação do EaBv na produção de anticorpos, foi realizado o ensaio de hemaglutinação.

O EaBv na dose de 20 mg/kg foi capaz de diminuir a hemaglutinação, conseqüentemente havendo nessa amostra, uma menor quantidade de anticorpos, quando comparado ao grupo controle. Nas doses de 2 e 200 mg/kg não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 6).

Figura 6. Efeito do extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* na produção de anticorpos.



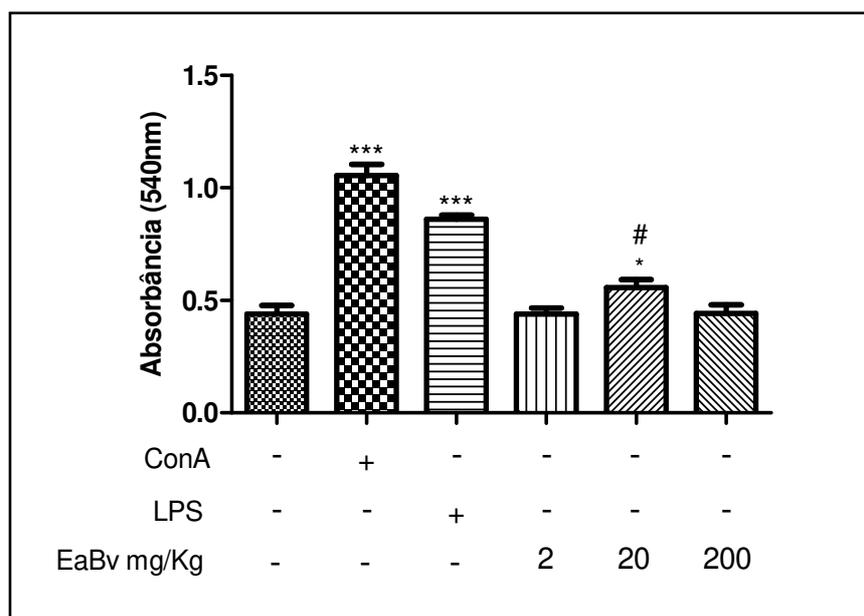
Animais tratados por via oral, com EaBv, por sete dias consecutivos, uma vez por dia, nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg, 200 mg/kg e o grupo controle (CTR) tratado com salina. Retirada do sangue periférico, obtenção do soro e realizado o ensaio de hemaglutinação. Os dados estão representados pela média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido com o teste de Newmann-Keuls. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle. NI = não imunizado.

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.4 Efeito do Extrato Aquoso da *Bowdichia virgilioides* na Proliferação de Linfócitos T e B.

No intuito de analisar se o tratamento com o EaBv era capaz de interferir na proliferação de células T e B foi realizado o ensaio de proliferação de linfócitos, utilizando como controle positivo o mitógeno para linfócitos T, no caso a ConA, e para linfócitos B, o LPS. Após o tratamento com EaBv foram retirados os linfonodos mesentéricos dos animais para obtenção dos linfócitos. Estas células foram cultivadas por 48 horas. O EaBv, somente na dose de 20 mg/kg foi capaz de aumentar a proliferação de linfócitos totais em cultura quando comparado ao grupo tratado com salina, como também quando comparado as doses de 2 e 200 mg/kg (Figura 7).

Figura 7. Efeito do extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* na proliferação de linfócitos.

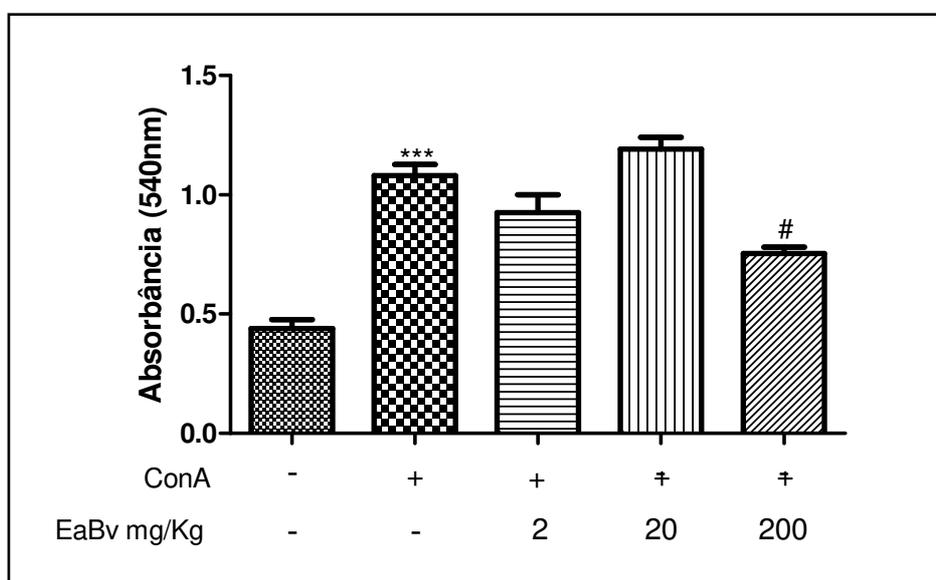


Animais tratados por via oral, com o EaBv, por sete dias consecutivos, uma vez por dia, nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg, 200 mg/kg e o grupo controle (CTR) tratado com salina. Retirada dos linfonodos mesentéricos, obtenção de linfócitos e deixados em cultura por 48 h. Os dados estão representados pela média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido com o teste de Newmann-Keuls. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. (***) $p \leq 0,001$ em relação ao controle. (#) $p \leq 0,05$ em relação às doses de 2 mg/kg e 200 mg/kg.

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Além de avaliar o efeito do EaBv na proliferação de linfócitos totais, o próximo passo foi verificar a ação desse tratamento nos linfócitos T. Para isso, após o tratamento com EaBv, as células obtidas dos linfonodos mesentéricos foram cultivadas na presença do mitógeno ConA. Nessas condições de tratamento, foi observado que o EaBv nas doses de 2 e 20 mg/kg não interferiu na proliferação de linfócitos T quando estimulados com ConA. No entanto, o EaBv na dose de 200 mg/kg, foi capaz de bloquear parcialmente mas, de modo significativo, a proliferação das células quando comparadas ao grupo controle estimulado com ConA (Figura 8).

Figura 8. Efeito do extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* na proliferação de linfócitos T.



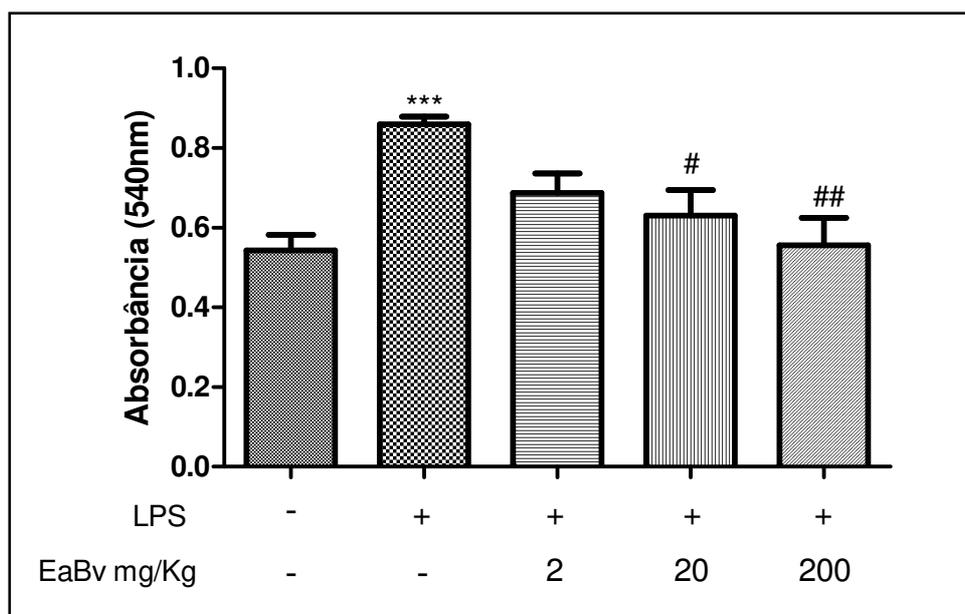
Animais tratados por via oral, com o extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* (EaBv), por sete dias consecutivos, uma vez por dia, nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg, 200 mg/kg e o grupo controle (CTR) tratado com salina. Retirada dos linfonodos mesentéricos, obtenção de linfócitos, cultivados em presença de ConA por 48h para avaliar a proliferação dessas células. Os dados estão representados pela média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido com o teste de Newmann-Keuls. (***) $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle. (#) $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle ConA.

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Dando continuidade a análise de interferência do tratamento com EaBv na proliferação de linfócitos, o próximo passo foi avaliar a ação do EaBv na proliferação

de linfócitos B. Nessas condições de tratamento, foi observado que as doses de 20 e 200 mg/kg foram capazes de diminuir a proliferação de linfócitos B na presença de LPS (Figura 9).

Figura 9. Efeito do extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* na proliferação de linfócitos B.



Animais tratados por via oral, com o extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* (EaBv), por sete dias consecutivos, uma vez por dia, nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg, 200 mg/kg e o grupo controle (CTR) tratado com salina. Retirada dos linfonodos mesentéricos, obtenção de linfócitos, cultivados em presença de LPS por 48 h. Os dados estão representados pela média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido com o teste de Newmann-Keuls. (***) $p \leq 0,001$ em relação ao controle. (#) $p \leq 0,05$ em e (##) $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle LPS.

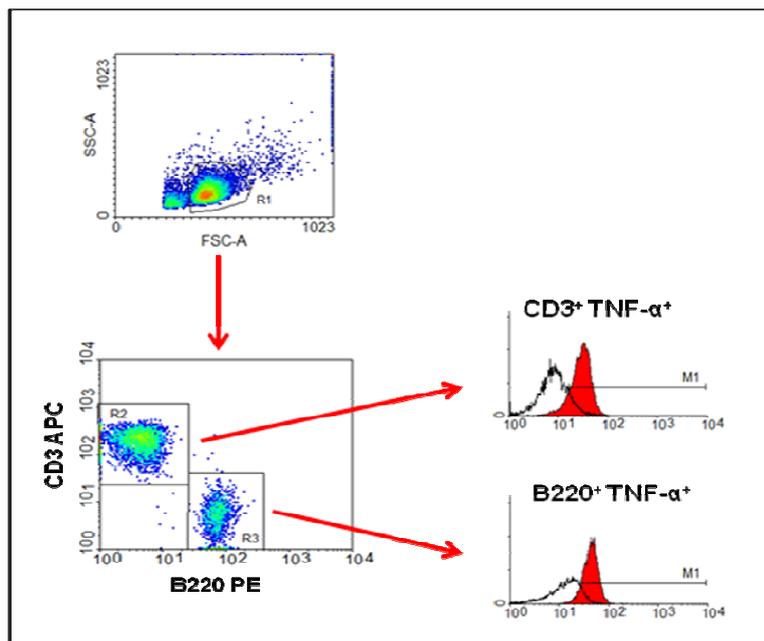
Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

5.5 Efeito do Extrato Aquoso da *Bowdichia virgilioides* na Expressão de Citocinas.

O próximo passo foi verificar a ação desse tratamento na expressão de citocinas, para isso, as células obtidas dos linfonodos mesentéricos foram submetidas a análise citofluorimétrica com marcação para as moléculas de superfície celular CD3 e B220, para linfócitos T e B, respectivamente. Em seguida,

foi realizada análise citofluorimétrica com a marcação intracelular para as citocinas TNF- α e IL-10 nas subpopulações de linfócitos T e B (Figura 10).

Figura 10. Representação esquemática para análise citofluorimétrica da expressão de citocinas em linfócitos T e B

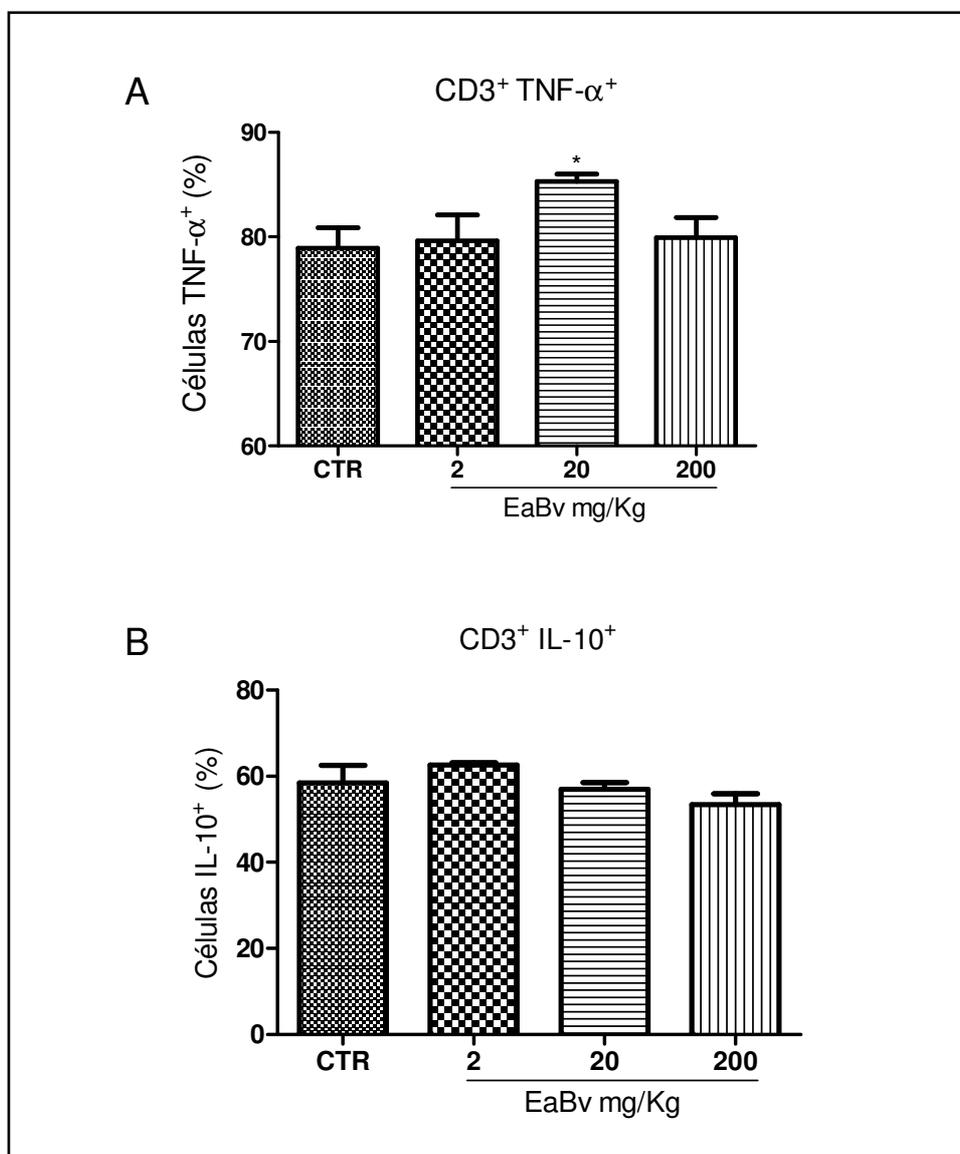


Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Os resultados demonstraram que o tratamento com EaBv na dose de 20 mg/kg foi capaz de aumentar a expressão de TNF- α em células T, quando comparada ao grupo controle, não sendo observado o mesmo efeito nas doses de 2 e 200 mg/kg (Figura 11A).

Em relação à citocina IL-10, o EaBv não foi capaz de modular sua expressão pelas células T em nenhuma das doses estudadas (Figura 11B).

Figura 11. Efeito do extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* na expressão de citocinas em linfócitos T.



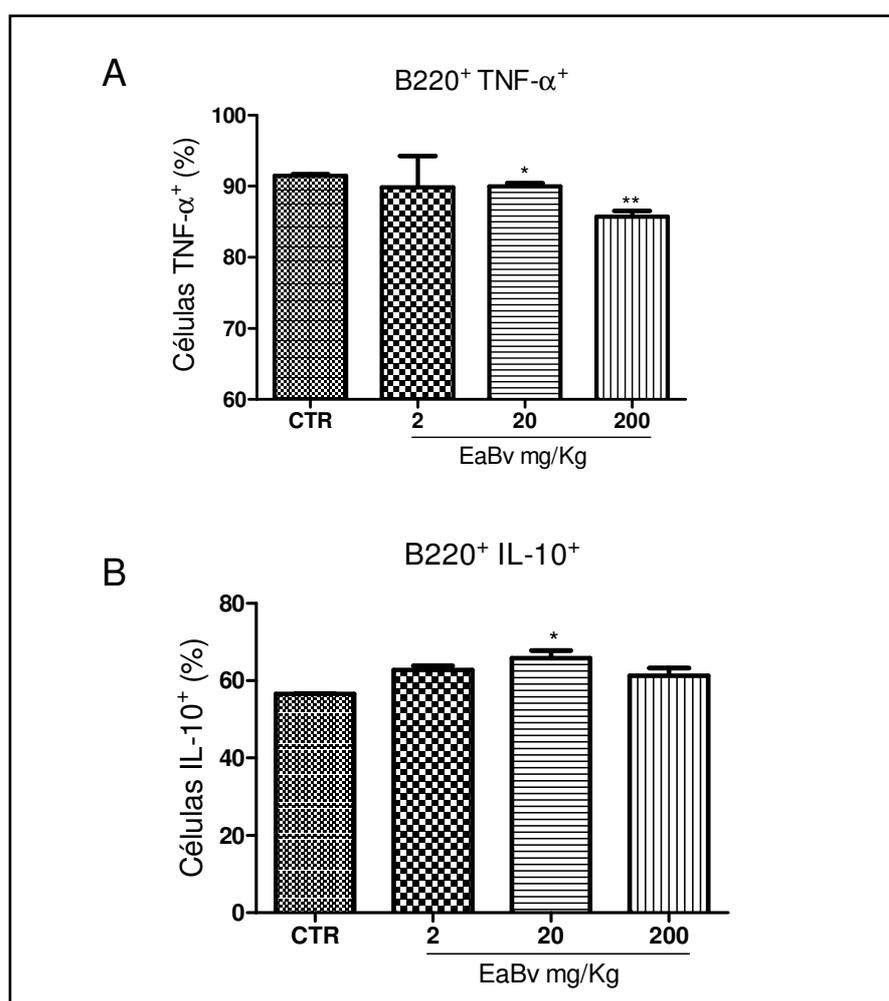
Animais tratados por via oral, com o extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* (EaBv), por sete dias consecutivos, uma vez por dia, nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg, 200 mg/kg e o grupo controle (CTR) tratado com salina. Retirada dos linfonodos mesentéricos, obtenção de linfócitos, marcação para célula T (CD3), permeabilização celular e marcação intracelular para citocinas. Em **A**, mostra a expressão de TNF- α e em **B** a expressão de IL-10 pelas células T. Os dados estão representados pela média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido com o teste de Newmann-Keuls. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle.

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Em relação aos linfócitos B, os resultados demonstraram que o EaBv nas doses de 20 e 200 mg/kg foram capazes de diminuir a expressão de TNF- α , quando comparada ao grupo controle (Figura 12A).

Ainda, foi observada a expressão de IL-10 pelos linfócitos B e como mostra a figura 12B, o EaBv na dose de 20 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente a expressão dessa citocina quando comparadas ao grupo controle.

Figura 12. Efeito do extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* na expressão de citocinas em linfócitos B.



Animais tratados por via oral, com o extrato aquoso da *Bowdichia virgilioides* (EaBv), por sete dias consecutivos, uma vez por dia, nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg, 200 mg/kg e o grupo controle (CTR) tratado com salina. Retirada dos linfonodos mesentéricos, obtenção de linfócitos, marcação para célula B (B220), permeabilização celular e marcação intracelular para citocinas. Em **A**, mostra a expressão de TNF- α e em **B** a expressão de IL-10 pelas células B. Os dados estão representados pela média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido com o teste de Newmann-Keuls. (*) $p \leq 0,05$ e (**) $p \leq 0,01$ em relação ao controle.

Fonte: Autor desta dissertação, 2012.

Produtos naturais têm sido investigados e utilizados para aliviar e combater doenças desde o início da história da humanidade. Próximo aos anos de 1900, antes da "era dos sintéticos", 80% dos medicamentos eram obtidos de raízes, cascas e folhas (McChesney *et al.*, 2007). Em tempos mais recentes, os produtos naturais continuam sendo importantes fontes de medicamentos. Seu papel dominante torna-se evidente quando cerca de 60% de compostos anticancerígenos e 75% dos medicamentos para doenças infecciosas são obtidos ou derivados de produtos naturais (Newman *et al.*, 2003).

De fato, mais de 90% das atuais classes terapêuticas derivam de um protótipo de produto natural e, curiosamente, ainda hoje, cerca de dois terços a três quartos da população mundial depende de plantas medicinais para seus cuidados primários (OMS, 2003). Ainda, segundo a Organização Mundial de Saúde, é estimado que mais de 70% da população mundial faz uso de produtos naturais com fins terapêuticos, com um alto consumo principalmente na Ásia, África e América do Sul. Além disso, os principais fatores que tornam atraentes os produtos naturais para uso humano incluem a disponibilidade, custo-eficácia e segurança (Rasool e Sabina, 2009). Sendo assim, é pertinente a busca de novos compostos bioativos, derivados de produtos naturais, além disso, é importante esclarecer e comprovar a atividade biológica dos extratos que estão sendo usados na medicina popular, como é o caso do uso da *Bowdichia virgilioides*, espécie pertencente a família Fabaceae, que apesar de muito utilizada folcloricamente, ainda são escassos os registros científicos sobre sua ação no sistema imunológico.

Os resultados obtidos no presente estudo, utilizando o extrato aquoso da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* (EaBv), demonstraram que essa espécie vegetal teve ação sobre o sistema imunológico, os quais foram detectados por modular eventos *in vivo*.

Inicialmente para avaliar o efeito do EaBv foi analisada a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais residentes. Assim, quando os animais foram tratados, o EaBv foi capaz de aumentar a fagocitose pelos macrófagos peritoneais e aumentar a capacidade fagocítica dessas células, utilizando o modelo de zimosan. Dados anteriores de Bin-Hafeez e colaboradores (2003), com o extrato aquoso de

Trigonella foenum graecum L., administrado por via oral demonstraram um aumento no índice fagocitário e na capacidade fagocítica. Além disso, Cruz e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento por via intraperitoneal com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides*, foi capaz de aumentar o espriamento e a capacidade fagocítica dos macrófagos. Por outro lado, em modelo de peritonite por zimosan foi demonstrado que o EaBv reduziu a taxa de fagocitose de partículas de zimosan (Silva *et al.*, 2009). Este efeito do extrato sobre os macrófagos, oposto ao nosso, pode ser explicado por tratar-se de modelos de estudo distintos. Uma vez que no modelo aqui estudado, a fagocitose ocorreu *in vitro*, que é um sistema fechado, sugerindo que os macrófagos não sofreram a ação de citocinas produzidas por outras populações celulares presentes no peritônio, que poderiam estar modulando negativamente a ação fagocítica dessas células.

De acordo com Di Carlo e Fiore (1958), os mecanismos de mediação do reconhecimento e fagocitose da partícula de zimosan A são complexos. O zimosan A, um polissacarídeo de parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, é composto principalmente de glucano e resíduos manana. *In vitro*, essa partícula tem servido como modelo para o estudo da resposta imune inata, porque é capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias (Underhill *et al.*, 1999) e pode ativar complemento na ausência de imunoglobulinas (Fearon e Austen, 1977). Ainda de acordo com Fearon e Austen (1977), o zimosan A é capaz de ativar a via alternativa do complemento através de C3, que pode servir para amplificar a resposta inflamatória e pode explicar o aumento da fagocitose.

Os macrófagos são parte integrante do sistema imunológico, atuando como células fagocíticas, microbicidas e células tumoricidas efetoras. Através da interação com linfócitos os macrófagos desempenham um papel importante na iniciação e regulação da resposta imune (Gordon, 1998). Ainda em relação ao exposto acima, a fagocitose e morte de microrganismos invasores pelos macrófagos constituem linha inicial principal de defesa do corpo contra infecções (Hawiger, 2001; Hume *et al.*, 2002).

Observando o efeito do EaBv na resposta imune inata, especificamente na resposta de macrófagos em relação a fagocitose, o próximo passo foi avaliar o

potencial imunomodulador do EaBv na resposta imune adaptativa. Para isso, foi realizado o ensaio de contagem de leucócitos totais e diferenciais no sangue periférico após 7 dias de tratamento, no qual foi observado que o EaBv diminuiu o número total de leucócitos sanguíneos.

Em relação a contagem diferencial dos leucócitos, os resultados demonstraram que os animais tratados com o EaBv exibiram uma diminuição no número de neutrófilos e um aumento no número de linfócitos. Com base no resultado anterior, onde houve diminuição do número de leucócitos totais dos animais tratados com o EaBv, de fato, parece que o extrato está exercendo um efeito supressor sobre os neutrófilos, considerando-se que esta subpopulação celular é a de maior número no sangue periférico. Por outro lado, em relação ao número de linfócitos, o EaBv parece estar exercendo um efeito estimulador, o que foi demonstrado pelo aumento no número dessas células. Dados descritos por Mukherjee e colaboradores (2010), demonstraram que o tratamento com o extrato do rizoma e das sementes da espécie *Nelumbo nucifera* Gaertn foi capaz de diminuir o número de neutrófilos e aumentar o número de linfócitos no sangue periférico. Ainda nesse estudo foi demonstrado que houve a diminuição no número de basófilos, não sendo alterado o número de monócitos.

Em outro estudo, Lagarto e colaboradores (2011), buscaram avaliar a toxicidade aguda e subcrônica do tratamento por via oral com o extrato de *Calendula officinalis*, em ratos Wistar machos e fêmeas, em que demonstraram um aumento no número total de leucócitos e monócitos em fêmeas e, em machos, um aumento no número de neutrófilos e diminuição no número de linfócitos. Atsamo e colaboradores (2011) avaliaram a toxicidade subcrônica, no tratamento por via oral, do extrato aquoso da casca do caule de *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) em ratos. Como resultado foi demonstrado que o tratamento, por 28 dias consecutivos, foi capaz de aumentar o número total de leucócitos sanguíneos, não alterando o número de neutrófilos, linfócito, monócitos, eosinófilos e basófilos em nenhuma das doses testadas.

Segundo Tiwari e colaboradores (2004), uma variedade de leucócitos, incluindo neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos participam no

desenvolvimento de uma resposta imune. Dessas células, somente os linfócitos possuem os atributos diversificados, a especificidade da memória e reconhecimento do próprio/não-próprio. Todas as outras células desempenham um papel acessório, que serve para ativar os linfócitos, aumentar a eficácia da depuração de antígenos por fagocitose ou a secretar várias moléculas efetoras imunes. Assim, frente a esses resultados podemos sugerir que o uso do EaBv poderá ser benéfico nos casos de patologias onde ocorra uma baixa de linfócitos, como é o caso da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida que segundo Hellerstein e colaboradores (1999), apesar dos mecanismos subjacentes à depleção de células T CD4 não serem totalmente compreendidos, provavelmente incluem uma diminuição na produção de células T pelo timo e um aumento na taxa de destruição dessas células na periferia.

Dando continuidade a análise da ação do EaBv, investigamos a ação dessa espécie vegetal na resposta imune adaptativa, especificamente na resposta imune humoral contra HC. Nessa análise foi avaliado o efeito do extrato na produção de imunoglobulinas por linfócitos B, através da titulação de anticorpos no teste de hemaglutinação. Esse ensaio permite avaliar a produção de imunoglobulinas, no qual através da interação antígeno-anticorpo as hemácias formaram uma "rede de células", não deixando haver a precipitação celular e a conseqüente formação de um "grumo" no poço, sendo assim a hemaglutinação é considerada reagente.

Os resultados demonstraram que o tratamento com o EaBv foi capaz de diminuir a produção de anticorpos, ou seja, a hemaglutinação foi vista em uma diluição menor que o grupo controle, o que demonstra menor quantidade de anticorpos na amostra. O que mais uma vez sugere a existência de um efeito inibitório, desta feita, sobre a produção de anticorpos. Dados demonstrados por Pinto e colaboradores (2007), camundongos tratados por via oral, 7 dias consecutivos, na dose de 0,5 mg /kg do extrato aquoso da *Echinodorus macrophyllus* tiveram a produção de anticorpos inibida. Em outro estudo, Benencia e colaboradores (2000) demonstraram que os animais que receberam uma dose diária do extrato aquoso das folhas de *Trichilia glabra*, nas dose de 4 mg/kg, tiveram uma diminuição na produção de anticorpos. Ainda, Fakeye e colaboradores (2008) demonstraram que ratos tratados por via oral, com o extrato aquoso da *Hibiscus sabdariffa* L., por 28 dias, a dose de 300 mg/kg foi capaz de diminuir a produção de

anticorpos. Entretanto, Makare e colaboradores (2001), mostraram que o tratamento com o extrato alcoólico de *Mangifera indica* L., por via oral, durante 15 dias, aumentou a produção de anticorpos nas doses de 200 mg/kg, 400 mg/kg e 800 mg/kg. Já resultados descritos por Bin-Hafeez e colaboradores (2003), onde o extrato aquoso de *Trigonella foenum graecum* L., administrado por via oral, por 10 dias consecutivos, uma vez por dia, as doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 250 mg/kg, demonstraram aumentar a produção de anticorpos.

Outra análise feita para avaliar as ações imunomoduladoras do EaBv, foi o ensaio de proliferação de linfócitos. Os resultados demonstraram que o EaBv foi capaz de aumentar a proliferação de linfócitos. A proliferação de linfócitos induzida por Con A é comumente usada como um método de detecção da atividade de linfócitos T *in vitro* (Cerqueira et al., 2004), enquanto que a proliferação de linfócitos induzida por LPS é freqüentemente usado para detectar atividade de linfócitos B (Cerqueira et al., 2004; von Andrian e Sallusto, 2007). A proliferação de linfócitos é um modo primário de resposta destas células a sinais inflamatórios (Boyman et al., 2007; Krammer et al., 2007). Investigar os efeitos de substâncias naturais que promovem ou inibem a proliferação de células imunes, é importante para se estudar imunomodulação e descobrir novos fármacos (Harizi et al., 2011).

Em relação a proliferação de linfócitos T, quando estimulada com ConA, um mitógeno conhecido para linfócitos T, por 48 horas, foi observado que o tratamento com o EaBv interferiu na ação do Con A sobre as células T, ou seja, após o tratamento com o extrato, os linfócitos T não responderam de uma forma eficaz ao mitógeno, sendo a proliferação dessas células menor que a proliferação do grupo controle (células não tratadas em presença de ConA), sugerindo uma interferência do extrato sobre a estimulação das células pelo mitógeno.

Na proliferação de linfócitos B, estimulados por LPS, foi demonstrado que o tratamento com o EaBv interferiu na ação do LPS sobre a proliferação dessas células, sendo essa proliferação celular menor que a proliferação das células do grupo controle (células não tratadas em presença de LPS). Entretanto, estes resultados não foram consequência de morte celular, uma vez que não houve diferença significativa na viabilidade dos linfócitos do grupo tratado com salina

quando comparado aos grupos tratados com o EaBv. Mais uma vez, o extrato demonstra interferir sobre a ação mitogênica, desta feita, do LPS.

A resposta ao mitógeno é iniciada pela ligação aos seus receptores, e uma diminuição na resposta ao mitógeno pode ser devido a uma diminuição na expressão de receptores de mitógenos pelos linfócitos (Chakrabarti *et al.*, 1994). Benencia e colaboradores (2000), demonstraram o efeito do extrato aquoso da *Trichilia glabra* sobre a resposta proliferativa dos linfócitos do baço, estimulados por LPS, em que o tratamento com o extrato nas concentrações de 20 µg/mL, 40 µg/mL e 80 µg/mL foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos B.

Os resultados demonstraram que o tratamento com o EaBv foi capaz de interferir negativamente na produção de anticorpos bem como na ação do LPS sobre a proliferação de células B. Sugerindo assim, que essa espécie vegetal poderá ser utilizada futuramente no combate a doenças auto-imunes, nas quais a produção de auto-anticorpos está presente, como exemplo na artrite reumatóide (Schellekens *et al.*, 1998), esclerose sistêmica (Arora-Singh *et al.*, 2010), e lúpus eritematoso sistêmico (Saha *et al.*, 2011).

A modulação do sistema imunológico é complexa e envolve a presença de células efetoras e reguladoras, e alterações neste sistema podem resultar em patogênese (Davis e Kuttan, 2000) como câncer (Bultz e Carlson, 2005), as doenças cardiovasculares (Busse *et al.*, 2001) e diabetes (Sepa *et al.*, 2005).

Buscando avaliar o efeito do EaBv na produção de citocinas, realizamos a marcação de citocina intracelular, tendo os resultados demonstrado que o EaBv foi capaz de aumentar a produção de TNF- α em células T. Apesar da principal fonte celular de TNF ser constituída por fagócitos mononucleares ativadas, células T estimuladas, podem também secretar essa citocina (Abbas *et al.*, 2007). Pode-se sugerir então, que o tratamento com EaBv foi capaz de ativar as células T e assim aumentar a produção dessa citocina. No entanto, em linfócitos B, o EaBv foi capaz de diminuir a produção de TNF- α .

Em relação a IL-10, não foi observada modulação da expressão dessa citocina pelas células T. Entretanto, o EaBv foi capaz de aumentar significativamente a expressão de IL-10 pelas células B. O'Garra e colaboradores (1990), demonstraram a produção da citocina IL-10 pelos linfócitos B quando estimulados por LPS. Recentemente foi demonstrado que IL-10 produzida por células B regulatórias inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimula a diferenciação de células T regulatórias (Mauri e Bosma, 2012). Alshaker e colaboradores (2011) demonstraram que a administração intraperitoneal do extrato hidrofílico da *Eriobotrya japonica*, aumentou significativamente a produção de IFN- γ no tecido do baço e pulmão de camundongos.

Os resultados obtidos demonstraram que na maioria dos parâmetros estudados, a dose de 20 mg/kg foi a mais eficiente na indução da função imunitária. Vale ressaltar que a constituição química do extrato aquoso da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* ainda permanece incerta. No entanto, a partir do extrato etanólico do caule da *B. virgilioides* já foram relatadas classes de substâncias tais como as benzofuranas (Melo *et al.*, 2001), flavonas (Arriaga *et al.*, 2000; Juck *et al.*, 2006) e alcalóides (Barbosa-Filho *et al.*, 2004). Relatos a respeito da ação da *B. virgilioides* em modular o sistema imunológico, são os estudos 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.

Tomados como base os resultados obtidos, é possível sugerir que essa espécie tem ação sobre as respostas imunes, ou seja, efeitos imunoestimulantes e imunossupressores, a depender da resposta imunológica avaliada. Estudos sugerem que a ação de extratos naturais com respostas diversas está relacionada aos diferentes constituintes presentes nas frações/extratos afetando assim a saturação responsiva das células para as respostas imunológicas (Rezaeiipoor *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2004). Kovacević e colaboradores (2006) sugerem que os diferentes componentes químicos dos extratos de origem vegetal podem agir de forma independente, antagônica ou sinérgica sobre o sistema imunológico. Além disso, segundo Rezaeiipoor e colaboradores (2000), os diferentes componentes dos extratos podem ter absorção intestinal diferenciada.

O conjunto de resultados obtidos neste estudo sugere que o extrato aquoso da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* exerce efeitos sobre o sistema imunológico, tendo ações estimuladoras e supressivas.

Dentre seus efeitos imunoestimuladores, o extrato da *Bowdichia virgilioides* foi capaz de: aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais e o número de linfócitos no sangue periférico; estimular a proliferação dos linfócitos e produção de citocinas TNF- α pelas células T.

Dentre seus efeitos imunossupressores, o extrato da *Bowdichia virgilioides* foi capaz de: diminuir o número de leucócitos totais no sangue periférico evidenciado pelo o número de neutrófilos, a produção de anticorpos, e a produção da citocina TNF- α pelas células B. Além disso, o extrato foi capaz de interferir na ação da ConA sobre a proliferação de linfócitos T e na ação do LPS sobre a proliferação de linfócitos B e, ainda, aumentar a produção de IL-10 por células B.

De uma forma geral, podemos sugerir que o extrato aquoso da casca do caule da *Bowdichia virgilioides* teve ação no sistema imunológico em camundongos, sendo o extrato um futuro candidato a ser utilizado na obtenção de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos fármacos fitoterápicos ou de novos agentes terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 6^a ed, Editora Saunders 2007.
- Akira S. Innate immunity and adjuvants. Philosophical Transcriptions of Royal Society. Biological Sciences. 2011; 366: 2748–2755.
- Albuquerque KA, Guimarães RM, Almeida IF, Clemente ACS. Métodos para superação da dormência em sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth). Ciências agrotécnicas. 2007; 6: 31.
- Alfano M, Poli G, Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. Molecular Immunology. 2005; 42:161–82.
- Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. Immunity. 2002; 27:190–202.
- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC. 1998; pp. 464.
- Alshaker HA, Qinna NA, Qadan F, Bustami M, Matalaka KZ. *Eriobotrya japonica* hydrophilic extract modulates cytokines in normal tissues, in the tumor of Meth-A-fibrosarcoma bearing mice, and enhances their survival time. Complementary and Alternative Medicine. 2011; 11:1-11.
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, De La Fuente M. Differential expression of Toll-like receptor 2 and 4 on peritoneal leukocyte populations from long-lived and non-selected old female mice. Biogerontology. 2010; 11:475–482.
- Arriaga, A.M.C., Gomes, G.A., Braz-Filho, R., 2000. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. Fitoterapia. 71, 211–212.
- Arora-Singh RK, Assassi S, Junco DJ, Arnett FC, Perry M, Irfan U, Sharif R, Mattar T, Mayes MD. Auto immune diseases and autoantibodies in the first degree relatives of patients with systemic sclerosis. Journal of Autoimmunity. 2010; 35:52–57.
- Atsamo AD, Nguenefack TB, Datté JY, Kamanyi A. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. Journal of Ethnopharmacology. 2011; 134:697–702.
- Avni O, Rao A. T cell differentiation: a mechanistic view. Current Opinion in Immunology. 2000; 12:654–659.
- Barbosa-Filho JM, Almeida JRS, Costa VCO, Da-Cunha EV, Silva MS, Braz-Filho R. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. Journal of Asian Natural Products Research. 2004; 6(1):11-17.

Batista Jr. ML, Santos RV, Cunha LM, Mattos K, Oliveira EM, Seelaender MC, Costa R.L.F. Changes in the pro-inflammatory cytokine production and peritoneal macrophage function in rats with chronic heart failure. *Cytokine*. 2006; 34:284-290.

Barreiro EJ, Júnior CV, Bolzani VS. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*. 2006; 29(2):326-337.

Barros WM, Rao VSN, Silva RM, Lima JCS, Martins DTO. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* H.B.K stem bark. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2010; 82(3):609-616.

Bell D, Young JW, Banchereau J. Dendritic cells. *Advanced Immunology*. 1999; 72:255–324.

Benencia F, Courreges MC, Coulombie FC. In vivo and in vitro immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* aqueous leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000 ; 69:199–205.

Bianchi ME. DAMPS, PAMPS and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 81:1–5.

Bin-Hafeez B, Ahmed I, Haque R, Raisuddin S. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 75:13-18.

Bin-Hafeez B, Haque R, Parvez S, Pandey S, Sayeed I, Raisuddin S. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Tigonella foenum graecum* L.) extract in mice. *International Immunopharmacology*. 2003; 3:257-265.

Bohlin L, Göransson U, Alsmark C, Wedén C, Backlund A. Natural products in modern life science. *Phytochemical review*. 2010; 9:279-301.

Bos H, Souza W. Phagocytosis of yeast: a method for concurrent quantification of binding and internalization using differential interference contrast microscopy. *Journal of immunological methods*. 2000; 238:29-43.

Bouaziz JD, Yanaba K, Tedder TF. Regulatory B cells inhibitors of immune responses and iflamation. *Immunological Reviews*. 2008; 224:201-214.

Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis, *Current Opinion in Immunology*. 2007; 19:320–326.

Brandão MGL, Grandi TSM, Rocha EMM, Sawyer DR, Krettli AU. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*. 1992; 36(2):175–182.

Bultz BD, Carlson LE. Emotional distress in patients with cancers: the sixth vital sense. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23:6440–6441.

Busse M, Lambert G, Fluttert M, Eikelis N. Cardiovascular and behavioural responses to psychological stress in spontaneously hypertensive rats: effect of treatment with DSP-4. *Behavioural Brain Research*. 2001; 119:131–142.

Calbo E, Garau J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001; 35:107–113.

Carvalho ACCS, Almeida DS, Melo MGD, Cavalcanti SCH, Marçal RM. Evidence of the mechanism of action of *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 122:374–378.

Cechinel-Filho V, Yunes A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos para otimização da atividade. *Química Nova*. 1998; 21:11.

Cerqueira FA, Cordeiro-Da-Silva C, Simões FGM, Pinto MM, Nascimento MS. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B-lymphocyte proliferation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2004; 12:217–223.

Cerutti A, Puga I, Cols M. Innate control of B cell responses. *Trends in Immunology*. 2011; 32:202–211.

Chakrabarti R, Jung CY, Lee TP, Liu H, Mookerjee BK. Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin. *Journal of Immunology*. 1994; 152:2660–2668.

Chaudhuri N, Sabroe I. Basic science of the innate immune system and the lung. *Paediatric respiratory reviews*. 2008; 9:236–242.

Choo MK, Park EK, Han MJ, Kim DH. Antiallergic activity of ginseng and its Ginsenosides. *Planta Medica*. 2003; 69:518–522.

Citerne HL, Pennington RT, Cronk QCB. An apparent reversal in floral symmetry in the legume *Cadia* is a homeotic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(32):12017–12020.

Cruvinel WM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC. Immune system – Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Brazilian Journal of Rheumatology*. 2010; 50(4):434–461.

Cruz GVB, Pereira PVS, Patrício FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB, Aragão-Filho WC, Maciel MCG, Silva LA, Amaral FMM, Barroqueiro ESB, Guerra RNM, Nascimento FRF. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 111:148–154.

Das B, Tandon V, Saha N. Anthelmintic efficacy of *Flemingia vestita* (Fabaceae): alterations in glucose metabolism of the cestode, *Raillietina echinobothrida*. *Parasitology International*. 2004; 53:345–350.

Dattner AM. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. *Dermatology Therapy*. 2003; 16:106–113.

Davis L, Kuttan G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 71:193-200.

Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Munõz 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. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 77:91–98.

Di Carlo FJ, Fiore J.V. On the composition of Zymosan. *Science*. 1958; 127:756–757.

Dunn-Walters DK, Ademokun AA. B cell repertoire and ageing. *Current Opinion in Immunology*. 2010; 22:514–520.

Ezekowitz R, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1990; 172:1785–1794.

Fakeye TO, Pal A, Bawankule DU, Khanuja SPS. Immunomodulatory Effect of Extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Family Malvaceae) in a mouse model. *Phytotherapy Research*. 2008; 22:664–668.

Fearon DT, Austen KF. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977; 74:1683–1687.

Flannagan R, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Natautal Review in Microbiology*. 2009; 7:355-366.

Flannagan R, Jaumouillé V, Grinstein S. The Cell Biology of Phagocytosis. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011 ; 7:49–86.

Fong HH. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects. *Integrative Cancer Therapies*. 2002; 1:287– 3293.

Gao S, Wang Y, Zhang P, Dong Y, Li B. Subacute oral exposure to dibromoacetic acid induced immunotoxicity and apoptosis in the spleen and thymus of the mice. *Toxicological Sciences*. 2008 ; 105(2):331–341.

Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual Review of Immunology*. 1998; 16, 495–521.

Gautam M, Saha S, Bani S, Kaul A, Mishra S, Patil D, Satti NK, Suri KA, Gairola S, Suresh K, Jadhav S, Qazi GN, Patwardhan B. Immunomodulatory activity of

Asparagus racemosus on systemic Th1/Th2 immunity: implications for immunoadjuvant potential. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 121(2):241-247.

Gessani S, Belardelli F. Expression in Macrophages and its Possible Biological Significance. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 1998; 9:117-123.

Goodarzi H, Trowbridge J, Gallo RL. Innate Immunity: A cutaneous Perspective. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2007; 33:15–26.

Gordon S. The macrophage: past, present and future. *European Journal of Immunology*. 2007; 37:9–17.

Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation. *Research in Immunology*. 1998; 149:685–688.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews. Immunology*. 2005; 5:953-964.

Gray D, Gray M, Barr T. Innate responses of B cells. *European Journal of Immunology*. 2007; 37(12):3304-3310.

Guerra RA, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, Souza EL, Toledo M.A., Silva-Filho RN. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006; 16(1).

Harizi H, Chaabane F, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*. *Cell. Immunology*. 2011; 267(2):94-101

Harrington L, Hatton R, Mangan P, Turner H, Murphy T, Murphy K, Weaver C. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*. 2005; 6:1123–1132.

Harwood NE, Batista FD. Early events in B cell activation. *Annual Review of Immunology*. 2010; 28:185–210.

Hawiger J. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunologic Research*. 2001; 23:99–109.

Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune JM. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nature medicine*. 1999; 5:83–89.

Hertzog P, Forster S, Samarajiwa S. Systems Biology of Interferon Responses. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2011; 31:5-11.

Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. *Current Opinion in Immunology*. 2003; 15:578–84.

Hoebe K, Beutler B. LPS, dsRNA and the interferon bridge to adaptive immune responses: Trif, Tram, and other TIR adaptor proteins. *Journal of Endotoxin Research*. 2004; 10:130–136.

Hogarth PM. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. 2002; 14:798–802.

Holloway AF, Shannon MF. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Molecular Immunology*. 2001; 38:567-580.

Hong S, Jeong H, Chung H, Kim H, Chae H, Shin T, Seo Y, Kim H. An herbal formula, Herbkinex, enhances cytokines production from immune cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 98:149-155.

Howard M, Garra A, Ishida H. Biological properties of interleukin 10. *Journal of Clinical Immunology*. 1992; 12:239-247

Huang N, Han S, Hwang I, Kehrl J. B cells productively engage soluble antigen-pulsed dendritic cells: visualization of live-cell dynamics of B cell-dendritic cell interactions. *The Journal of Immunology*. 2005; 175:7125–7134.

Hume DA, Ross SR, Himes R.T. Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002; 72:621–627.

Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology*. 2006; 18:49–53.

Hong S, Jeong H, Chung H, Kim H, Chae H, Shin T, Seo Y, Kim H. An herbal formula, Herbkinex, enhances cytokines production from immune cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 98:149-155.

Janeway CA, Walport PTM, Shlomchik M. *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença*. 7ª Ed. São Paulo: Artmed. 2001.

Juck DB, De Rezende LC, David JP, De Queiroz LP, David JM. Two new isoflavonoids from *Bowdichia virgilioides*. *Natural Product Research*. 2006; 20:27–30.

Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Cruvinel WM, Andrade LEC, Silva NP. Immune System – Part II Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Brazilian Journal of Rheumatology*. 2010; 50(5):552-580.

Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006; 117:979–987.

Kanjwani DG, Marathe TP, Chiplunkar SV, Sathaye SS. Evaluation of Immunomodulatory activity of methanolic extract of *Piper betel*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008; 67:589–593.

Koppel EA, Wieland CW, Van Den Berg VCM, Litjens M, Florquin S, Van Kooyk Y, Van Der Poll T, Geijtenbeek TBH. Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1

(SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *European Journal of Immunology*. 2005; 35:2962–2969.

Kovacević N, Colić M, Backović A, Doslov-Kokorus Z. Immunomodulatory effects of the methanolic extract of *Epimedium alpinum* in vitro. *Fitoterapia*. 2006; 77:561-567.

Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells, *Nature Review. Immunology*. 2007; 7:532–542.

Kurosaki T. B-lymphocyte biology. *Immunological Reviews*. 2010; 237:5–9.

Lagarto A, Bueno V, Guerra I, Valde´s O, Vega Y, Torres L. Acute and subchronic oral toxicities of *Calendula officinalis* extract in Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2011; 63:387–391.

Lee KH, Choi EM. Stimulatory effects of extract prepared from the bark of *Cinnamomum cassia blume* on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytotherapy Research*. 2006; 20(11):952-960.

Lees JR, Azimzadeh AM, Bromberg JS. Myeloid derived suppressor cells in transplantation. *Current Opinion in Immunology*. 2011; 23:692–697.

Lima HC. *Bowdichia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2011. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB022834>

Mahajan SG, Mehta AA. Immunosuppressive activity of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. in experimental immune inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 130:183–186.

Makare N, Bodhankar S, Rangari V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2001; 78:133-137.

Malek TR. The Biology of Interleukin-2. *Annual Review in Immunology*. 2008; 26:453–479.

Mandel T, Phipps R, Abbot A, Tew J. The follicular dendritic cell: long-term antigen retention during immunity. *Immunological Reviews*. 1980; 53:29–59.

Mariscalco MM. Innate Immunity in critical care. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 2006; 17:25-35.

Martin F, Kearney JF. B-cell subsets and the mature pre-immune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a “natural immune memory”. *Immunological Reviews*. 2000; 175:70–79.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 13:453–461.

Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Reviews in Immunology*. 2012; 30:221–241.

Mazzoni A, Segal DM. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004; 75:721–730.

McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*. 2007; 68:2015–2022.

Medzhitov R, Janeway CJr. Innate immunity. *The New England Journal of Medicine*. 2000; 343:338-344.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007; 449:819-826.

Melo FN, Navarro VR, Silva MS, Da-Cunha EV, Barbosa-Filho JM, Braz-Filho R. Bowdenol, a new 2,3-dihydrobenzofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*. *Natural Products Letters*. 2001; 15(4):261-266.

Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *The Journal of Immunology*. 2006; 176(2):705-710.

Mukherjee D, Khatua TN, Venkatesh P, Saha BP, Mukherjee PK. Immunomodulatory potential of rhizome and seed extracts of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 128:490–494.

Mungantiwar AA, Nair AM, Shinde UA, Dikshit VJ, Saraf MN, Thakur VS, Sainis KB. Studies on the immunomodulatory effects of *Boerhaavia diffusa* alkaloidal fraction. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 65:125–131.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*. 2003; 66 (7):1022–1037.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews. Immunology*. 2008; 8:34–47.

O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, Barbis D, Stal, A, Cupp J, Moore K. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *International Immunology*. 1990; 2(9):821-32.

OMS. WHO Guidelines on Good Agricultural and Collections Practices (GACP) for Medicinal Plants. World Health Organization, 2003. Geneva.

Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*. 2006; 24:497–518.

Park H, Li Z, Yang X, Chang S, Nurieva R, Wang Yh, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*. 2005; 6:1133–1141.

Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: Networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007; 147:199–207.

Pasare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity*. 2004; 21:733–741.

Pinto AC, Rego GCG, Siqueira AM, Cardoso CC, Reis PA, Marques EA, Coelho MGP, Sabino KCC. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 111:435–439.

Platt N, Gordon S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SRA) multifunctional?—The mouse's tale. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001; 108:649–654.

Poth AG, Colgrave ML, Lyons RE, Daly NL, Craik DJ. Discovery of an unusual biosynthetic origin for circular proteins in legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(25):10127–10132.

Pozzi LA, Maciaszek JW, Rock KL. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *The Journal of Immunology*. 2005 ; 175:2071–2081.

Preynat-Seauve O, Schuler P, Contassot E, Beermann F, Huard B, French L.E. Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen- presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection. *The Journal of Immunology*. 2006; 176:61–67.

Puri A, Saxena R, Saxena KC, Tandon JS. Immunostimulant activity of *Nyctanthus arbor-tristis* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 1994; 42:31–37.

Rasool M, Sabina E.P. Appraisal of immunomodulatory potential of *Spirulina fusiformis*: an in vivo and in vitro study. *Journal of Natural Medicines*. 2009; 63:169–175.

Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annual Review of Immunology*. 2001; 19:275–290.

Rezaeipoor R, Saeidnia S, Kamalinejad M. The effect of *Plantago ovata* on humoral immune responses in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 72:283–286.

Robert C, Lu X, Law A, Freeman TC, Hume DA. Macrophages.com: An on-line community resource for innate immunity research. *Immunobiology*. 2011; 216:1203–1211.

Rudin CM, Thompson CB. B-Cell Development and Maturation. *Seminar in Oncology*. 1998; 25(4):435-446.

Sabroe I, Parker LC, Dockrell DH, Davies DE, Dower SK, Whyte MK. Pulmonary Perspective: targeting the networks that underpin contiguous immunity in asthma and COPD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007; 175:306–311.

Saha S, Tieng A, Pepeljugoski KP, Zandamn-Goddard G, Peeva E. Prolactin, Systemic Lupus Erythematosus, and Autoreactive B Cells: Lessons learnt from murine models. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2011; 40:8–15.

Santos LC, Antônio MS. Homem da Natureza Brasileira: ciência e plantas medicinais no início do século XIX. *História, Ciências, Saúde*. 2008; 15:1025-1038.

Sepa A, Wahlberg J, Vaarala O, Frodi A, Ludvigsson J. Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in children. *Diabetes Care*. 2005; 28:290–295.

Shalhoub J, Falck-Hansen MA, Davies AH, Monaco C. Innate immunity and monocyte macrophage activation in atherosclerosis. *Journal of Inflammation*. 2011; 8(9):1-17.

Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998; 101:273–281.

Shalhoub J, Falck-Hansen MA, Davies AH, Monaco C. Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis. *Journal of Inflammation*. 2011; 8:1-17.

Siegmund B, Zeitz M. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2011; 17(27):3178-3183.

Silva JP. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* KUNTH. Dissertação de mestrado. (2009). Universidade Federal de Alagoas.

Silva JP, Rodarte RS, Calheiros AS, Souza CZ, Amendoeira FC, Martins MA, Silva PMR, Frutuoso VS, Barreto E. Antinociceptive Activity of aqueous extract of *Bowdichia virgilioides* in mice. *Journal of Medicinal Food*. 2010; 13(2):1–4.

Souza VH, Barbosa APO, Cardoso GC, Marreto RN, Barreto-Filho JAS, Antonioli AR, Santos MRV. Avaliação do potencial antidiabético de cinco plantas medicinais em ratos. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2009; 28(4):609-612.

Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity*. 2005; 22:539–550.

Stuart LM, Ezekowitz RA. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nature reviews. Immunology*. 2008; 8:131-141.

Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature Reviews. Immunology*. 2002; 2:580–592.

Taur DJ, Patil RY. Evaluation of antiasthmatic activity of *Clitoria ternatea* L. roots. *Journal of Ethnopharmacology*. 201 ; 136:374–376.

Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2005; 23:901–944.

Thomazzi SM, Silva CB, Silveira DC, Vasconcellos CL, Lira AF, Cambui EV, Estevam CS, Antonioli AR.. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 127(2):451-456.

Tiwari U, Rastogi B, Singh P, Saraf DK, Vyas SP. Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 92:113–119.

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. 1999; 401:811 – 815.

Van-Ginderachter JA, Movahedi K, Ghassabeh GH, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*. 2006; 211:487–501.

Veloza LSM, Silva BP, Bernado RR, Parente JP. Odorantin-7-O- β -D-glucopyranoside from *Bowdichia virgilioides*. *Phytochemistry*. 1999; 52:1473-1477.

von Andrian UH, Sallusto F. Lymphocyte activation. *Current Opinion in Immunology*. 2007; 19:247–248.

Wang JX, Tang W, Shi LP, Wan J, Zhou R, Ni J, Fu YF, Yang YF, Li Y, Zuo JP. Investigation of the immunosuppressive activity of artemether on T-cell activation and proliferation. *British Journal of Pharmacology*. , 2007; 150(5):652-661.

Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*. 2003; 301:1374–1377.

Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology*. 2007; 25:821-852.

Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003; 64:3-19.

Wykes M, Pombo A, Jenkins C, Macpherson G. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *The Journal of Immunology*. 1998, 161:1313–1319.

Zakaria ZA, Ghan ZDFA, Mohd RNSRN, Gopalan HK, Sulainan MR, Abdullah FC. Antinoceptive and Anti-inflammatory activities of *Dicranopteris linearis* leaves chloroform extract in experimental animals. *Yakugaku Zasshi: Journal of Pharmaceutical Society of Japan*. 2006; 126(11):1179-1203.