



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Roberta Ghilosso Bortolini

Modulação por *Sucupira (Pterodon polygalaeflorus, Benth)* da distribuição de Linfócitos T ativados e T de memória em linfonodos (LN) de camundongos com Artrite Induzida por Colágeno tipo II (CIA) e da mielopoiese em baços de camundongos primados com Adjuvante Completo de Freund (AFC)

Rio de Janeiro
2005

Roberta Ghilosso Bortolini

Modulação por *Sucupira (Pterodon polygalaeflorus, Benth)* da distribuição de Linfócitos T ativados e T de memória em linfonodos (LN) de camundongos com Artrite Induzida por Colágeno tipo II (CIA) e da mielopoiese em baços de camundongos primados com Adjuvante Completo de Freund (AFC)



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Ranto Dalmau

Rio de Janeiro

2005

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B739 Bortolini, Roberta Ghilosso.
Modulação por Sucupira (*Pterodon polygalaeflorus*, Benth) da distribuição de Linfócitos T ativados e T de memória em linfonodos (LN) de camundongos com Artrite Induzida por Colágeno tipo II (CIA) e da mielopoiese em baços de camundongos primados com Adjuvante Completo de Freund (AFC) / Roberta Ghilosso Bortolini.. – 2013.

115 f. : il.

Orientador: Sérgio Ranto Dalmau.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-Graduação em Biociências.

1. *Pterodon polygalaeflorus* - Teses. 2. Artrite reumatóide - Teses. I. Dalmau, Sérgio Ranto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.72-002.77

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Roberta Ghilosso Bortolini

Modulação por Sucupira (*Pterodon polygalaeflorus*, Benth) da distribuição de Linfócitos T ativados e T de memória em linfonodos (LN) de camundongos com Artrite Induzida por Colágeno tipo II (CIA) e da mielopoiese em baços de camundongos primados com Adjuvante Completo de Freund (AFC)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 11 de outubro de 2005.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Ranto Dalmau

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a. Dra. Andrea Henriques Pons
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof^a. Dra. Claudia Sondermann Freitas
Instituto Nacional de Câncer - INCA

Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2005

DEDICATÓRIA

...aos meus avós, aos meus pais, ao meu noivo...

AGRADECIMENTOS

A oportunidade de realizar uma dissertação me permitiu descobrir grandes amizades, desde amigos que já passaram por essa fase de pós-graduação, e que então me entendem completamente, até aqueles que nunca se atreveram e se atreverão a isso por serem, acima de tudo, sensatos, são amigos que me acalmam ao falar da vida em geral, me permitindo desapegar das mazelas da Ciência. A todos esses amigos preciso agradecer atentamente, o que farei pessoalmente.

Agradeço a Deus por me permitir ter uma vida com tantas conquistas e com tantas pessoas especiais comigo num mundo tão cheio de diferenças sociais e com poucas oportunidades.

Agradeço a Nossa Senhora da Paz que desde a prova de Inglês na seleção do mestrado me atende com tanto carinho a cada visita. À Nossa Senhora Desatadora de Nós, Santo Expedito, São Judas Tadeu, Santo Antônio...também...

Aos meus pais, Vera e Luiz Carlos, líderes natos, desde o colegial até hoje (e parece que tudo começou num desses encontros de presidentes de grêmio-estudantil...), duas pessoas extremamente realizadas pessoal e profissionalmente, obrigada por permitirem que a gente, eu e meus irmãos, também conquistemos nossos sonhos. Com meus pais a gente pode fazer de tudo, como essa loucura de fazer “pós” no Rio de Janeiro em tempos de Lula no poder e Império de Fernandinho Beira-mar nesta cidade. Fortes e otimistas, mesmo sendo realistas, a “máxima” dos meus pais é não se arrepender por não ter feito algo e, para isso, eles nos apóiam em tudo!!!! Muito obrigada por tttuuuuddooo.

Meus irmãos, Marco e Dani, obrigada pelo apoio e compreensão e por estarmos fortificando nossa amizade.

Fer, “valeu” pelos chimarrões quentinhos nas madrugadas de estudos, pelos vários pronto-atendimentos que recebi (ela é uma veterinária talentosa...), pela companhia.... nos shows na beira da praia de Copa e Ipanema, as idas a pizzaria Guanabara pela madrugada,...aos nossos momentos inesquecíveis.

Aos meus avós, agradeço por terem ensinado o valor de uma família aos meus pais, por serem exemplos de responsabilidade, coragem e força de vontade. Em especial agradeço a minha Vó Nilda, com quem tenho mais contato, por ser uma grande amiga de todas as horas. PhD na “Vida”, ela sempre tem uma frase madura para acalmar a minha impaciência.

Aos meus tios e primos que nos visitaram. Em especial, agradeço ao Tio Beto (que bateu o recorde de visitas!!!) pela atenção sempre expressa numa ligação ou em um e;mail, sempre um amigo zeloso, e sem dúvida um dos economistas e administradores que mais entende de Imunofarmacologia!!!

O gosto do desafio me faz perceber a vida. Mas nem sempre é fácil superá-lo. Concluir essa etapa Rio-Mestrado conforme inicialmente planejado só foi possível porque conheci o Luiz. Desde o primeiro dia de conversa (e só poderia ter sido num congresso) ele me entendeu e até hoje me apóia. Não há palavras que descrevam a minha gratidão pelo convívio diário de exatos 2 anos, sempre compreendendo o meu mal humor e minhas reclamações (e são muitas, não é?), minha necessidade de discutir as minhas idéias quanto a experimentos...às vezes de madrugada...e algumas vezes durante nossas viagens....

Se algo valeu a pena (não foi por alma grande), foi por ter principalmente te conhecido..

< ♪ *Eu sei que vou te amar, ...*>

Ter ao lado um fiel escudeiro sempre me acolhendo com palavras sinceras

< ♪ *Por toda a minha vida ...*>

... se preocupando comigo, sempre buscando alternativas para as adversidades....

< ♪ *....eu vou te amar ...*>

...amigo que dividiu comigo a angústia destes últimos dias.....

< ♪ *eu sei que vou sofrer....*>

me faz perceber a sorte de descobrir o verdadeiro significado do amor, ou de algo além disso, sem definição, ainda bem!, como Marta Medeiros uma vez escreveu.....

< ♪ *....a eterna desventura de viver...>*

..por mais distante que tenhamos que viver por alguns anos (talvez), estarei sempre

...

< ♪ *a espera de viver ao lado seu POR TODA A MINHA VIDA....>*

.....

De forma muito especial, gostaria de agradecer ao meu orientador pela suprema paciência que expressou nesses longos dois anos e meio de dissertação. Tendo suportado o convívio com uma gaúcha (e são chatas, não?) que não se adaptou a uma metrópole (onde o senso/ atitudes sociais são tão discutíveis), longe da família e amigos. Questões pessoais a parte, eu conheci a dura, política e desanimadora realidade da pesquisa no Brasil realizando esse mestrado, apesar de

ter feito iniciação científica desde o segundo semestre de faculdade, com duas publicações ainda na graduação, premiação no salão IC da UFRGS, e recebendo o meu primeiro salário de uma “Biotec” no dia da minha formatura (marketing pessoal é tudo!). Mesmo tendo optado idealistamente por fazer o mestrado e aqui no Rio de Janeiro, não imaginei que enfrentaria obstáculos pessoais e profissionais com tanta dificuldade. Portanto, agradeço por ter sido meu mestre, mas acima de tudo um amigo, compreendendo meus conflitos pa-ci-en-te-men-te. Agradeço por termos chegado até o fim, pois sua ajuda foi fundamental. Guardarei os nossos momentos de discussão de resultados nos botecos de Ipanema, com muito carinho.

Prof^a. Marsen, obrigada por ter sido uma amiga, quando precisei de apoio; mãe, quando precisei de colo; e orientadora, quando mais precisei da sua experiência. Serei sempre grata, estando sempre à disposição para retribuir sua atenção, onde quer que eu esteja pesquisando.

Aos estimados alunos estagiários Felipe e Fernanda, agradeço por cada segundo de convívio. Aprendemos muito juntos.

Sem mais delongas, agradeço:

À UERJ, ao estado do Rio de Janeiro, e a FAPERJ pela realização deste trabalho. À pós-graduação, por compreender nossas dificuldades neste projeto e por ter nos auxiliado a finalizar este estudo. Em especial, agradeço a secretária da pós, minha amiga Mônica, pela preocupação, envolvimento e ajuda quando precisei de apoio, principalmente nesses últimos meses. Às “meninas do Citômetro”, em destaque Simone, obrigada por toda a paciência e atenção; muitas vezes fiz vocês saírem mais tarde...

Aos professores do LIABPPN, Prof^a. Márcia e Prof^a. Mécia pelo incentivo à pesquisa, pelo exemplo de pesquisadoras e por se preocuparem com a minha formação. Em especial, agradeço a “referee” desta dissertação, Prof^a. Kátia, por ter sido prestativa sempre que precisei de um simples favor, ou para esclarecer uma pequena dúvida, e por ter se dedicado a revisar este estudo, mesmo aos “pedaços”!

A Prof.^a Adriane Todeschini agradeço pela atenção de sempre, pelas dicas e advertências sobre RJ quando logo cheguei aqui (como fiquei assustada...), pelas nossas conversas comparativas RJ/RS que nos remontam a nossa serra, pela preocupação com a minha formação, enfim, por ser uma amiga gaúcha.

A todos colegas do LIABPPN agradeço pela ajuda e preocupação comigo, em especial, Amanda e Mônica, verdadeiras amigas. Agradeço a Patrícia e Fernanda

Lima por terem me ajudado na realização deste projeto. Em especial, Fernanda, gostaria de expressar minha sincera gratidão pela sua paciência, dedicação e acima de tudo coleguismo, dividindo humildemente seu conhecimento, com entusiasmo e sabedoria de uma verdadeira professora – quase mestra!!! Para minha amiga Nívea, todo o meu carinho em gratidão por toda a ajuda e, claro, companhia. Aos técnicos Gustavo, Beto, Paulinho, Cris e Carlos pela amizade, carinho e ajuda. À Michele pela atenção aos animais de laboratório, sem os quais este trabalho não existiria.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Jayme, por serem muito prestativos, amigos, dedicados colegas, que me socorreram muitas vezes.

A Banca Examinadora pela aceitação do convite, mesmo com o prazo mínimo para análise da dissertação.

Aos amigos que cederam reagentes, listo:

- Andrés Cañedo (UFRGS) e Leonardo Teixeira (INCA) – primeiro amigo da minha geração a fazer “sandwich”, no doutorado, em Harvard!!!;
- Andréa Henriques Pons, Wagner e Luiz Anastácio Alves;
- Prof. Eloy Garcia, meu pai científico, por ter comprado o anticorpo anti-CD11b para o nosso grupo. Idealizador do mestrado aqui no Rio, meu orientador na vida, me deixou alguns legados....além do exemplo de dignidade, benevolência e compaixão.

Àqueles que de alguma forma prejudicaram a dissertação, seja por prepotência, negligência ou qualquer outra “ênica” do gênero, como até mesmo “fofocas”, deixo as palavras de um digno imortal, não incluído politicamente na Academia Brasileira de Letras...

“Aqueles que atravancaram o meu caminho:

Eles passarão,

Eu passarinho....”

Mário Quintana

Não acreditamos em reumatismo, nem em amor verdadeiro, até o primeiro ataque.

Marie Von Ebner-Eschenbach

RESUMO

BORTOLINI, Roberta Ghilosso. *Modulação por Sucupira (*Pterodon polygalaeflorus*, Benth) da distribuição de Linfócitos T ativados e T de memória em linfonodos (LN) de camundongos com Artrite Induzida por Colágeno tipo II (CIA) e da mielopoiese em baços de camundongos primados com Adjuvante Completo de Freund (AFC)*. 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

Sementes de árvores do gênero *Pterodon*, conhecidas principalmente pelo nome Sucupira, são utilizadas popularmente para o tratamento de doenças reumáticas. Na presente dissertação, temos como objetivo estudar a possível ação do extrato hidroalcoólico de sementes de *Pterodon polygalaeflorus* (EHPp) no tratamento de Artrite Induzida por Colágeno tipo II (CIA) em camundongos DBA/1J. Verificou-se a distribuição de Linfócitos T CD4⁺ com fenótipo de memória em linfonodos de animais com CIA; a possível interferência do tratamento no segundo aumento de células mielóides (Mac-1⁺) esplênicas gerado pela segunda injeção de colágeno tipo II (CII) para indução da CIA e confirmou-se o fenótipo granulocítico dessas células mielóides. Além disso, através de outro modelo experimental de 10 dias de duração, objetivou-se estudar as células mielóides Mac-1⁺: se o tratamento com EHPp interfere na mielopoese esplênica induzida somente pela injeção de Adjuvante de Freund Completo (AFC) em camundongos DBA1/J e avaliar uma eventual diferença entre o grau de ativação dessas células em animais primados com AFC tratados ou não com EHPp. A CIA foi induzida em camundongos DBA/1J machos, por injeção intradérmica (i.d.) de CII em AFC com reforço intraperitoneal de CII três semanas após a primeira injeção. O tratamento oral, diário, com EHPp por cerca de 30 dias foi iniciado no dia do reforço com CII. No modelo de curta duração, com o intuito de verificar o possível aumento de células Mac-1⁺ no baço, os animais foram tratados oralmente com EHPp, por 9 dias, sendo o AFC injetado, i.d., no 5^o dia do tratamento e os animais sacrificados no 10^o. Os resultados obtidos foram: o tratamento com EHPp interfere na distribuição de Linfócitos T com fenótipo de memória em animais com indução de CIA; resultados preliminares sugerem que o tratamento com EHPp não interfere no segundo aumento de células mielóides no baço no modelo CIA; a maioria das células mielóides presentes no baço de animais saudáveis ou de animais com CIA apresenta fenótipo granulocítico (GR.1⁺); o tratamento com EHPp reduz significativamente a mielopoese esplênica induzida pela injeção de AFC; a fração significativa de células Mac-1⁺ no baço de animais primados com AFC apresenta aumento de produção de Espécies Reativas de Oxigênio em relação aos animais saudáveis ou tratados com EHPp. Em conjunto, estes resultados permitem identificar uma possível ação anti-inflamatória do EHPp ao impedir o aumento de células inflamatórias no baço de animais primados com AFC, bem como uma atividade imunossupressora, evidenciada pela redução de Linfócitos com perfil de recém ativação e de Linfócitos com perfil de memória nos LNs em relação aos animais com CIA, sugerindo o seu envolvimento nos processos de ativação e de migração linfocitários.

Palavras-chave: *Pterodon polygalaeflorus*. Artrite Induzida por Colágeno tipo II. Imunomodulação.

ABSTRACT

Seeds of the *Pterodon* gender trees, mainly known as Sucupira, have been used by folk medicine to treat rheumatoid diseases. The present study aims: to study the possible action of hydroalcoholic extract of *Pterodon polygalaeflorus* (EHPp) seeds in the treatment of Collagen Induced Arthritis (CIA) in DBA/1J mice. It was verified the Lymphocyte memory phenotype distribution in animals lymphonods (LNs) with CIA; a possible EHPp treatment interference on the second increase of splenic mieloid cells (Mac-1⁺) caused by CII booster for CIA induction and it was confirmed the granulocyte phenotype of those mieloids cells. Besides, with another experimental model with 10 days duration, we studied the myeloid cells Mac-1⁺: if the EHPp treatment interferences in splenic myelopoiesis induced by AFC injection in DBA/1J mice and to evaluate casual difference between the activation degree of those cells in animals AFC primed treated or not with EHPp. The CIA was induced in DBA/1J male mice, with intradermally (i.d.) injection of CII in AFC with a CII booster intraperitoneally (i.p.) three weeks after the first injection. The daily oral treatment with EHPp, during 30 days, started on the CII booster day. In the short duration model, with the intention to verify the possible increase of Mac-1⁺ cells in the spleen, the animals were orally treated with EHPp, once a day, during 9 days, and the AFC i.d. injection performed in the 5th day of treatment and the animals were sacrificed on the 10th day. The results were: the EHPp treatment interferes on Lymphocyte T distribution with memory phenotype in animals with CIA; preliminar results indicate that EHPp treatment does not interfere on the second increase of splenic mieloid cells caused by CII booster injection to induce CIA; mieloid cells in the spleen of health animals or in animals injected with AFC have granulocytic phenotype (GR.1⁺); the EHPp treatment reduced the splenic mielopoiesis induced by AFC injection; significant fraction of Mac-1⁺ cells in spleen of primed AFC animals treated with EHPp had an increased production of the oxygen reactive species in relation of health animals and EHPp treated animals. Together, those results indicate a possible anti-inflammatory action of EHPp because it prevented inflammatory cells increase in the spleen of AFC primed animals, and also an immunosuppressive activity, since it reduced Lymphocyte recently activated and memory Lymphocytes in the LNs of CIA animals related to CIA animals. It suggests a possible EHPp action in activation and migration Lymphocytes processes.

Keywords: *Pterodon polygalaeflorus*. Type II Collagen Induced Arthritis. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Artropatia deformante crônica e severa em humanos (modificado de Rosenberg, 2005) e em camundongos DBA/1J.....	26
Figura 2 – Análise histológica comparativa de articulações humana com AR (A) e de camundongo DBA/1J com CIA (B)	26
Figura 3 – Esquema ilustrativo do experimento para avaliação da possível modulação por EHPp da mielopoiese induzida por AFC no baço.....	44
Figura 4 – Esquema ilustrativo do experimento de indução de artrite (CIA) em camundongos DBA/1J tratados com EHPp	47
Figura 5 – Efeito do EHPp sobre o edema de patas na CIA	57
Figura 6 – Efeito do EHPp sobre o tamanho de linfonodos de camundongos que sofreram indução de CIA	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Efeito terapêutico do EHPp em camundongos com CIA	55
Gráfico 2 –	Número absoluto de células nos linfonodos inguinais.....	59
Gráfico 3 –	Efeito do EHPp no número relativo das subpopulações de linfócitos nos linfonodos.....	60
Gráfico 4 –	Número absoluto de subpopulações linfocitárias em linfonodos.....	62
Gráfico 5 –	Controle intra-experimental das marcações triplas de células de linfonodos de animais saudios.....	63
Gráfico 6 –	Análise citofluorimétrica da expressão de CD69 nas subpopulações de linfócitos nos linfonodos.....	64
Gráfico 7 –	Número absoluto de células CD69 ⁺ entre as subpopulações linfocitárias de linfonodos.....	66
Gráfico 8 –	Análise citofluorimétrica da expressão de CD44 nas subpopulações de linfócitos em linfonodos.....	67
Gráfico 9 –	Número absoluto de células CD44 ^{hi} entre as subpopulações linfocitárias de linfonodo.....	69
Gráfico 10 –	Número relativo de células L-sel ^{-/in} entre células CD3 ⁺ e CD3 ⁻ de linfonodos.....	71
Gráfico 11 –	Número absoluto de células L-sel ^{-/in} entre células CD3 ⁺ e CD3 ⁻ de linfonodos.....	72
Gráfico 12 –	Análise citofluorimétrica da expressão de L-selectina nas subpopulações de linfócitos CD4 e CD8 em linfonodos.....	74
Gráfico 13 –	Número absoluto de células Lsel ^{-/in} entre as subpopulações linfocitárias de linfonodo.....	75
Gráfico 14 –	Análise citofluorimétrica da expressão de CD45RB em subpopulações de linfócitos de linfonodos.....	77
Gráfico 15 –	Número absoluto de células CD45RB ^{hi} entre as subpopulações linfocitárias de linfonodos.....	78
Gráfico 16 –	Número relativo de células Mac-1 ⁺ em baços de DBA/1J primados ou não com AFC e tratados com água ou etanol 15%.....	80

Gráfico 17 – Número relativo de células Mac-1 ⁺ em baços de DBA1/J não primados com AFC tratados com etanol ou EHPp (5 mg/kg)...	81
Gráfico 18 – Expressão de células Mac-1 ⁺ em baços de DBA1/J primados com AFC e tratados com etanol ou EHPp.....	83
Gráfico 19 – Número relativo de células Mac-1 ⁺ em baços de DBA1/J primados com AFC e tratados com etanol ou EHPp.....	84
Gráfico 20 – Número absoluto de células de baços de DBA1/J primados com AFC e tratados com etanol ou EHPp 0,5 mg/kg.....	85
Gráfico 21 – Atividade oxidativa em células Mac-1 ⁺ de baços de DBA1/J primados com AFC e tratados com etanol ou EHPp (0,5 e 5 mg/kg).....	87
Gráfico 22 – Expressão de Mac-1 ⁺ em baços de camundongos DBA1/J com CIA e tratados com etanol ou EHPp.....	88
Gráfico 23 – Expressão de GR.1 entre células Mac-1 ⁺ em baços de DBA1/J com CIA e tratados com EHPp.....	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Anticorpos (Ac) e sonda utilizados nos experimentos de indução de mielopoiese em baços induzida por AFC.....	40
Quadro 2a –	Anticorpos utilizados nos experimentos de CIA (continua).....	40
Quadro 2b –	Anticorpos utilizados nos experimentos de CIA (conclusão)..	41
Quadro 3 –	Adaptação do uso popular da Sucupira em AR para estudo na CIA.....	43
Quadro 4 –	Distribuição dos grupos de animais estudados no experimento de indução de mielopoiese em baços de camundongos primados com AFC e tratados com EHPp.....	45
Quadro 5 –	Distribuição dos animais em grupos para estudo do experimento de indução da CIA e tratamento com EHPp.....	48
Quadro 6 –	Marcações triplas realizadas em células de linfonodos de animais com CIA tratados ou não com EHPp.....	50
Quadro 7a –	Desenvolvimento da CIA em diferentes vias, compartimentos e moléculas envolvidas neste modelo (continua).....	95
Quadro 7b –	Desenvolvimento da CIA em diferentes vias, compartimentos e moléculas envolvidas neste modelo (conclusão).....	96
Quadro 8 –	Moléculas importantes na melhora e/ou supressão da CIA.....	97
Quadro 9 –	Citocinas que aumentam a CIA.....	98
Quadro 10 –	Citocinas que diminuem a CIA.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a –	Estudos publicados sobre possíveis propriedades farmacológicas anti-artríticas de extratos ou substâncias derivadas de plantas que utilizaram o modelo experimental CIA.....	27
Tabela 1b –	Estudos publicados sobre possíveis propriedades farmacológicas anti-artríticas de extratos ou substâncias derivadas de plantas que utilizaram o modelo experimental CIA (conclusão).....	28
Tabela 2 –	Percentagem de células que expressam CD69 nas subpopulações de linfócitos de linfonodos.....	65
Tabela 3 –	Percentagem de células que expressam CD44 nas subpopulações de linfócitos de linfonodos.....	68
Tabela 4 –	Percentagem de células que expressam L-selectin nas subpopulações de linfócitos de linfonodos.....	73
Tabela 5 –	Percentagem de células que expressam CD45RB ^{hi} nas subpopulações de linfócitos de linfonodos.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
Ac.Ac.	Ácido acético
Adm.	administração
AFC	Adjuvante de Freund Completo
AFI	Adjuvante de Freund Incompleto
AIA	Artrite induzida por Adjuvante
AINES	Anti-inflamatório não esteroide
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Artrite Reumatóide
CD	“Cluster Designation”
CIA	Artrite induzida por colágeno
CII	Colágeno tipo II
COMP	Sigla, em inglês, de proteína da matriz oligomérica da cartilagem
Cy/ QR	Cychrome/ Quantum Red
D.P.	Desvio padrão
DN	Duplo negativo
DNA	Sigla, em inglês, de Ácido desoxirribonucleico
EHPp	Grupo de animais primados com AFC tratados com EHPp
EHPp	Extrato Hidroalcoólico de sementes de <i>Pterodon polygalaeflorus</i>
ELISA	Imunoensaio enzimático
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH	Etanol (referência ao grupo que foi tratado com etanol 15%)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward Scatter
HLA	Sigla, em inglês, de Antígeno Leucocitário Humano
i.d.	intradérmica
i.p.	Intraperitoneal
IFN- γ R KO	Camundongos Knock-out para receptor de interferon γ

Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LN	Linfonodo
MMP	Metaloproteinases da matriz
MT/MCA	medicina tradicional e complementar/ alternativa
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.c.	Peso corporal
p.s de sementes	Peso seco de sementes
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
PIA	Artrite induzida por Pristane
PMN	Leucócito Polimorfonuclear
SSC	Side Scatter
SUS	Sistema Único de Saúde
Th	Linfócito T helper
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	20
1	OBJETIVOS	38
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1	Animais	39
2.2	Material Botânico	39
2.3	Equipamentos	39
2.4	Reagentes	40
2.4.1	<u>Para Citometria de Fluxo</u>	40
2.4.2	<u>Outros reagentes</u>	41
2.5	Material Especial	42
2.6	Obtenção do Extrato Hidroalcoólico de Sementes de <i>P. polygalaeflorus</i> (EHPp)	42
2.7	Tratamento dos Camundongos DBA/1J com EHPp no Modelo de Mielopoiese em Baço Induzida por AFC e no Modelo CIA	43
2.8	Avaliação do Efeito do Extrato Hidroalcoólico de Sementes de <i>Pterodon polygalaeflorus</i> (EHPp) na Mielopoiese - Expansão da População de Células Mac-1⁺ (CD11b) - em Baços de Camundongos Primados com Adjuvante de Freund Completo (AFC)	44
2.8.1	<u>Indução da Mielopoiese e Tratamento dos Animais</u>	44
2.8.2	<u>Marcação de Células do Baço com Anticorpo Anti-CD11b (PE)</u>	46
2.8.3	<u>Marcação Celular com Sonda para Identificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)</u>	46
2.9	Estudo do Efeito Antiartrítico do Extrato Hidroalcoólico de Sementes de <i>Pterodon polygalaeflorus</i> (EHPp)	47
2.9.1	<u>Indução de Artrite Induzida por Colágeno tipo II (CIA) em Camundongos DBA/1J</u>	47
2.9.2	<u>Avaliação Clínica da CIA</u>	48
2.9.3	<u>Retirada e Preparação de Linfonodos para Análise em Citômetro de Fluxo</u>	49
2.9.4	<u>Marcação de Linfócitos de LN para Análise em Citômetro de Fluxo</u>	50
2.9.5	<u>Retirada e Preparação de Baços para Análise em Citômetro de Fluxo</u>	51

2.9.6	<u>Marcação de Células do Baço para Análise em Citômetro de Fluxo.....</u>	51
2.10	Análises no Citômetro de Fluxo	52
2.11	Análise Estatística.....	53
3	RESULTADOS.....	54
3.1	Efeito anti-artrítico do extrato hidroalcoólico de sementes de <i>Pterodon polygalaeflorus</i>.....	54
3.2	Efeito do extrato hidroalcoólico de sementes de <i>Pterodon polygalaeflorus</i> na mielopoiese em baço (expansão da população de células Mac-1⁺) de camundongos primados com Adjuvante de Freund Completo.....	79
4	DISCUSSÃO.....	90
5	CONCLUSÃO.....	101
	REFERÊNCIAS.....	102

INTRODUÇÃO

Artrite Reumatóide

Artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica de etiologia desconhecida que ataca primeiramente os tecidos sinoviais (Lipsky, 1994). Tal distúrbio inflamatório sistêmico pode afetar diversos tecidos e órgãos (pele, vasos sanguíneos, coração, pulmões e músculos), mas ataca principalmente as articulações, produzindo uma sinovite proliferativa e inflamatória não supurativa que geralmente progride para a destruição da cartilagem articular e anquilose das articulações (Rosenberg, 2005). Está associada a edema e dor em múltiplas juntas, mas em geral ocorre inicialmente nas articulações das mãos e dos pés (Sweeney & Firestein, 2004). Quando apresenta envolvimento multissistêmico, a morbidade e a gravidade da doença são maiores (Lipsky, 1994). A maioria dos pacientes apresenta um curso clínico flutuante, com períodos de melhora e exacerbação dos sintomas articulares (Lipsky, 1994).

A artrite reumatóide costuma ser dividida quanto à severidade da doença, (Felson *et al.*, 1995), em:

- leve: paciente apresenta artralguas em pelo menos 3 articulações, com sinais de inflamação, nenhuma doença extra-articular, fator reumatóide costumeiramente negativo, elevação dos reatores de fase aguda (proteína C reativa e velocidade de eritrossedimentação) e nenhuma evidência de erosão ou perda de cartilagem ao estudo radiográfico;
- moderada: paciente com 6 a 20 articulações acometidas, comumente a doença é restrita às articulações, elevação de reatores de fase aguda, positividade do fator reumatóide, evidência de inflamação ao estudo radiográfico;
- grave: mais de 20 articulações persistentemente acometidas, elevação dos reatores de fase aguda, anemia de doença crônica, hipoalbuminemia, fator reumatóide positivo, estudos radiográficos demonstrando erosões e perda de cartilagem e doença extra-articular.

A prevalência de AR na maioria dos países industrializados varia entre 0,3 a 1%, e a prevalência global para AR característica é de 0,8% entre os adultos (Abdel-

Nasser *et al.*, 1997), com incidência de 36:100.000 em mulheres e de 14:100.000 em homens (Symmons *et al.*, 1994). Ela pode começar em qualquer idade, com pico de incidência entre a quarta e sexta década de vida (Pincus *et al.*, 1994). Em pacientes jovens a taxa de incidência mulher/homem é de cerca de 4/1, mas em pacientes que iniciaram a doença com idade mais avançada, a taxa é quase igual (Lee & Weinblatt, 2001). A incidência e a prevalência de AR geralmente aumentam com o acréscimo da idade, até os 70 anos, depois declinam (Linos *et al.*, 1980).

Pacientes com AR são freqüentemente afetados de diversas formas como deficiência física, declínio psicológico e sócio-econômico e redução da qualidade de vida (Pugner *et al.*, 2000). Viver com artrite reumatóide significa conviver com as limitações físicas, fadiga, perda de mobilidade e independência, dor, incertezas e mudanças relacionadas a períodos de exacerbação e remissão (Melanson & Downe-Wamboldt, 2003). Estima-se que entre 3 a 7 anos da vida de uma pessoa com AR são perdidos (Wicks *et al.*, 1988). O custo direto e indireto da AR para a sociedade é tremendo (Pugner *et al.*, 2000). Dados recentes sugerem que cuidados médicos de qualidade para o tratamento da artrite reumatóide excedem US\$ 6000 em 1 ano por paciente (Yelin & Wanke, 1999).

As principais causas de morte em indivíduos com AR são infecções, doenças renais e cardiovasculares (Wicks *et al.*, 1988; Finch, 2004). As causas exatas do aumento da suscetibilidade a desenvolver doenças infecciosas são desconhecidas, mas devem estar relacionadas aos distúrbios imunológicos associados com a doença ou ao efeito imunossupressor de agentes usados no tratamento (Doran *et al.*, 2002). O excesso de mortes por doenças cardiovasculares em AR é provavelmente atribuído à sobrecarregada e cumulativa resposta inflamatória da doença (Kvalvik *et al.*, 2000).

Apesar da causa da AR permanecer desconhecida, a auto-imunidade desempenha um papel-eixo em sua cronicidade e progressão (Rosenberg, 2005). Acredita-se que a AR seja uma doença autoimune desencadeada pela exposição de um hospedeiro geneticamente suscetível a antígenos artritogênicos (Rosenberg, 2005) como colágeno tipo I e II (Tarkowski *et al.*, 1989), proteínas não cartilaginosas e peptídeos citrulinados (Shellekens *et al.*, 1998) entre outras proteínas autólogas.

A genética desempenha claramente um papel significativo na determinação tanto do risco de desenvolvimento de AR quanto da gravidade da doença (Lipsky, 1994; Barton & Ollier, 2002). Estudos com gêmeos mostram que fatores genéticos

correspondem a cerca de 60% da predisposição da população para AR; gêmeos monozigóticos possuem uma taxa de concordância de 12 a 20%, gêmeos dizigóticos possuem uma taxa de concordância de 4 a 5%, sendo a prevalência geral da população de 0,5 a 8% (MacGregor *et al.*, 2000).

A associação de certos alelos do antígeno leucocitário humano (HLA), especialmente o HLA-DR4, está associado a um maior risco de desenvolver AR (Lipsky, 1994) devido a uma seqüência particular de aminoácidos na terceira região hipervariável da cadeia DRB1 (Wordsworth *et al.*, 1989; du Montcel *et al.*, 2005). O alelo HLA-DR pode ligar e demonstrar o antígeno artritogênico para o Linfócito T (Rosenberg, 2005). Entretanto, estudos populacionais sugeriram que apenas um terço do risco genético de AR é explicado por genes localizados na região HLA (Lipsky, 1994).

Logo, fatores ambientais como infecções virais e bacterianas (Malmström *et al.*, 2004) parecem ter um envolvimento substancial no desenvolvimento da AR. Fatores como idade, gênero, hormônios e estilo de vida (por exemplo, fumante) parecem também desempenhar papel no desenvolvimento da AR (Uhlig *et al.*, 1999; Symmons & Harrison, 2000). Adicionalmente, DNA de uma variedade de espécies de bactérias ou peptidoglicanos de bactérias foram detectados em articulações inflamadas (Wilkinson *et al.*, 1999; van der Heijden *et al.*, 2000). A AR pode necessitar da interação complexa de fatores genéticos e ambientais com o Sistema Imune e, por fim, com tecidos sinoviais em todo o corpo (Lipsky, 1994).

A atividade da doença leva em consideração 4 fatores básicos (Felson *et al.*, 1995):

- avaliação dos sintomas e estado funcional: graduação da dor articular, rigidez matinal e severidade da fadiga;
- avaliação do envolvimento articular e manifestações extra-articulares: as articulações devem ser avaliadas quanto ao edema, dolorimento, perda de movimento e deformidade. Manifestações extra-articulares, incluindo manifestações sistêmicas como febre, anorexia, náuseas e perda de peso devem ser investigadas
- marcadores laboratoriais: reatores de fase aguda (proteína C reativa e velocidade de eritrossedimentação) são marcadores inespecíficos que refletem o grau de inflamação sinovial;
- estudos radiológicos: acompanhamento com radiografias após 6 a 12 meses de tratamento e sua comparação com as iniciais colaboram para indicação de

atividade da doença (desenvolvimento ou piora de osteopenia e/ou erosões articulares e redução do espaço articular são indicativos de atividade da doença).

MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA ARTRITE REUMATÓIDE: ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO TIPO II (CIA)

Modelos experimentais utilizados para estudo da AR tais como Artrite Induzida por Colágeno tipo II (CIA) (Trentham *et al.*, 1977), Artrite Induzida por Proteoglicano (Glant *et al.*, 1987) ou por Proteína da Matriz Oligomérica da Cartilagem (COMP) (Carlsén *et al.*, 1998), Artrite Induzida por Adjuvante (AIA), Artrite Induzida por Pristane (PIA) (Wooley *et al.*, 1989) e Artrite Induzida por parede celular de *Streptococcus* têm contribuído para o entendimento da imunopatologia da artrite (Wooley, 1991). Imunizações com estes antígenos em óleos imunoestimulantes induzem o aparecimento de anticorpos contra esses constituintes da cartilagem (Wooley, 1991) e quando somente os óleos (Pristane; AFC; ou AFI) (Kato *et al.*, 1996) são inoculados geram uma inflamação cujo desenvolvimento ainda não está bem esclarecido (Matthys *et al.*, 2000).

A CIA tem sido demonstrada em três espécies: em ratos (Trentham *et al.*, 1977), em camundongos (Courtenay *et al.*, 1980) ou em primatas (Bakker *et al.*, 1991). Camundongos DBA/1J têm sido os mais utilizados no modelo CIA pela sua suscetibilidade genética ligada a genes do MHC classe II da mesma forma que em humanos (Bauer *et al.*, 2004), visto que machos DBA/1J podem desenvolver artrite espontaneamente nas patas posteriores (Matthys *et al.*, 2003).

Visto que a suscetibilidade de linhagens de camundongos à CIA é influenciada principalmente por genes da região MHC classe II, assim como na AR (Wooley *et al.*, 1981), a CIA tem uma ampla relevância no estudo da doença, particularmente para a contribuição de genes de MHC classe II no desenvolvimento da autoimunidade (Wooley & Chapedelaine, 1987). Identificou-se um gene classe II (A^q) que apresenta um papel crucial na suscetibilidade a CIA (Brunsberg *et al.*, 1994). Além disso, a CIA é o modelo experimental da doença preferido para o estudo da AR, pois ela apresenta reação autoimune contra o maior componente da cartilagem articular, o colágeno tipo II (CII) (Wooley & Chapedelaine, 1987). Neste

modelo, camundongos são inoculados i.d. com CII emulsificado em adjuvante de Freund completo (AFC), recebendo um reforço de CII i.p. 3 semanas após. Três a cinco dias após este reforço, inicia-se um rápido processo imunoinflamatório nas articulações, com edema das patas, principalmente as distais (Courtenay *et al.*, 1980).

O colágeno tipo II nativo é uma proteína com estrutura geneticamente conservada, dando origem a epítomos antigênicos com reação cruzada entre espécies (Wooley & Chapedelaine, 1987). O peptídeo imunodominante derivado da molécula de CII, que liga-se a molécula A variante q (A^q) associada à artrite, localiza-se entre as posições 256 e 270 do CII (Michaëlsson *et al.*, 1992). Este é um glicopeptídeo com um oligossacarídeo apontando em direção ao receptor de linfócito T o qual é reconhecido por uma ampla fração de linfócitos T CII- reativos (Corthay *et al.*, 1998). Interessante, o local de ligação de peptídeo da molécula A^q é muito similar ao das moléculas DR4 (DRB1*0401/DRA) e DR1 que são associadas a AR (Fugger *et al.*, 1996).

A resposta ao CII é potencializada pelo Adjuvante de Freund completo (AFC), um óleo mineral com parede celular de micobactéria (Holmdahl *et al.*, 2002). A resposta imune a CII envolve tanto mecanismos humoral como celular (Ranges *et al.*, 1985; Seki *et al.*, 1988). A resposta celular é mediada por T helper do tipo 1 (Mauri *et al.*, 1996) com uma intensa produção de IL-12 e INF- γ e, a humoral pela secreção de imunoglobulinas de todos os isotipos (Holmdahl *et al.*, 1985). Entretanto, em certas linhagens de camundongos, a artrite pode se desenvolver depois de uma imunização com CII e o óleo mineral sem parede de micobactéria, conhecido como Adjuvante de Freund Incompleto (AFI). Neste caso, a resposta imune é ligeiramente deslocada para uma resposta Th tipo 2 com uma dominância do isotipo IGg1 na resposta humoral. Então, as respostas Th 1 e Th 2 parecem contribuir para o desenvolvimento da artrite (Holmdahl *et al.*, 2002)

Publicações recentes ressaltam uma relação direta entre número de células mielóides e a potencialização da resposta imune no modelo CIA. O AFC parece desempenhar um papel fundamental, estimulando a mielopoiese (e.g., baço), aumentando a resposta inflamatória e por conseqüência a resposta imune ao CII. Este aumento, levando ao dobro as células Mac1⁺ no baço de camundongos DBA/1, tem seu máximo em 4-6 dias após a primeira injeção de CII emulsificado em AFC e é negativamente regulado por interferon gama (INF- γ) (Matthys *et al.*, 1999). Assim,

um passo inicial para a indução da CIA, bem como o seu grau de gravidade, parecem relacionados com o nível de mielopoiese induzida pelo AFC.

Interessante, com o intuito de investigar o papel do baço na patogênese de artrite induzida por parede celular de estreptococos, Kimpel e colaboradores (2003) realizaram esplenectomia dos camundongos que posteriormente sofreram a indução da artrite. Curiosamente, eles evidenciaram nestes camundongos uma expressiva diminuição da inflamação crônica nas articulações e danos histopatológicos, bem como alterações nos tipos celulares em linfonodos e sangue periférico, diminuindo mediadores inflamatórios, citocinas pro-inflamatórias e produção de óxido nítrico em relação aos controles. Concluindo que a esplenectomia deve remover um reservatório de antígenos importante e alterar a ativação de células imunes neste modelo experimental de artrite.

A severidade da artrite em murinos é correlacionada à quantidade de auto-anticorpos IgG anti-CII (Williams *et al.*, 1998) da mesma forma que em humanos (Kim *et al.*, 2000). Após ativação de Linfócitos T, uma cascata imunoinflamatória envolvendo Linfócitos T, Macrófagos/Monócitos, Linfócitos B e Sinoviócitos ativados é acionada. Diferentes leucócitos, que possivelmente contribuem para a formação de *pannus* (hiperplasia sinovial), e células sinoviais produzem citocinas e outros mediadores solúveis, tais como metaloproteinases da matriz (MMP) que levam à destruição da cartilagem e erosão do osso (Feldmann *et al.*, 1996).

Os animais com CIA desenvolvem a doença com sinais clínicos (Figura 1) e histopatologia (Figura 2) muito similares à de pacientes que sofrem de AR (Myers *et al.*, 1997). É caracterizada pela inflamação de múltiplas articulações, acompanhada por hiperplasia sinovial (*pannus*), infiltração de células mononucleares e destruição da cartilagem e do osso subcondral (Myers *et al.*, 1997).

Supressão do processo de inflamação pelo bloqueio de TNF por anticorpos monoclonais tem provado ser um tratamento efetivo no tratamento da CIA (Thorbecke *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1992), e estes achados levaram ao uso com sucesso de bloqueadores de TNF em múltiplos ensaios clínicos de fase I, II e III com pacientes com AR (Feldmann *et al.*, 1997), então validando os valores preditos da CIA como modelo para AR. Entretanto, roedores com CIA não produzem fator reumatóide IgM. Porém, 20% dos pacientes com AR também não; logo a CIA também poderia ser considerada um modelo para estudo de AR soronegativa (Wooley, 2004).



Figura 1. Artropatia deformante crônica e severa em humanos (modificado de Rosenberg, 2005) e em camundongos DBA/1J.

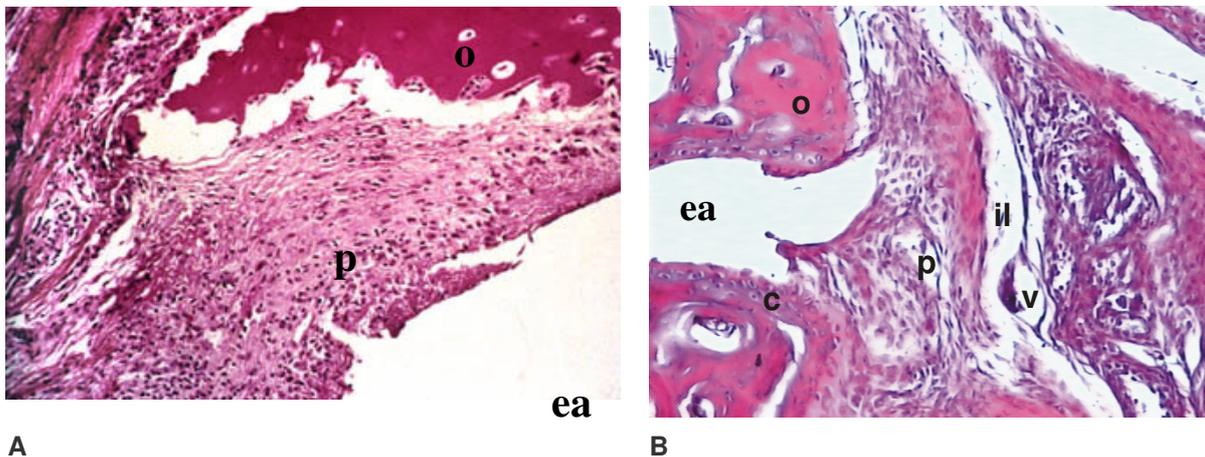


Figura 2. Análise histológica comparativa de articulações humana com AR (A) e de camundongo DBA/1J com CIA (B). Estas imagens enfatizam a natureza inflamatória da artrite: hiperplasia da membrana sinovial com migração/proliferação de Linfócitos, Plasmócitos e Macrófagos expandem a sinóvia. Osso (o), *pannus* (p) espaço articular (ea), vaso sanguíneo (v), infiltrado leucocitário (il). (modificado de Rosenberg, 2005, e Sabino, 2001, respectivamente).

O modelo experimental CIA tem sido muito aplicado em estudos sobre as propriedades farmacológicas de fitoterápicos. A seguir, as tabelas 1a e 1b apresentam alguns trabalhos selecionados na literatura.

Tabela 1a - Estudos publicados sobre possíveis propriedades farmacológicas anti-artríticas de extratos ou substâncias derivadas de plantas que utilizaram o modelo experimental CIA (continua).

Planta ou preparado	Nº	Substância(s)	A	Via	Sev.	Referência	País
<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook f.	1	-	C	O	↓	Gu <i>et al.</i> , 1992.	Canadá
TBL-1	?	-	C	O	↓	Li <i>et al.</i> , 1996.	Japão
<i>Xuanfa moyuan</i> principle	?	-	C	O	↓	Lu <i>et al.</i> , 1997.	China
<i>Amycolatopsis sulphurea</i>	1	Epoxi-quinomicinas	C	?	↓	Matsumoto <i>et al.</i> , 1997.	Japão
Keishi-bushi-to	5	-	R	O	↓	Wakabayashi <i>et al.</i> , 1997.	Japão
<i>Celastrus obiculatus</i>	1	dulcitol	C	O	↓	Kobayashi <i>et al.</i> , 1997.	Japão
<i>Tripteryg. wilfordii</i> Hook f.	1	-	C	O	↓	Asano <i>et al.</i> , 1998.	Japão
<i>Tripteryg. wilfordii</i> Hook f.	1	triptolide	R	O	↓	Gu <i>et al.</i> , 1998.	E.U.A.
<i>Taxus brevifolia</i>	1	taxol	R	?	↓	Arsenault <i>et al.</i> , 1998.	Canadá
Dae-bang-poong-tang	15	-	C	O	↓	Wang <i>et al.</i> , 1999.	Japão
<i>Pterodon pubescens</i>	1	-	C	O	↓	Sabino <i>et al.</i> , 1999.	Brasil
<i>Camellia sinensis</i> (chá verde)	1	polifenóis	C	O	↓	Haqqi <i>et al.</i> , 1999.	E.U.A.
<i>Canabis sattiva</i>	1	canabidiol	C	o; i.p.	↓	Malfait <i>et al.</i> , 2000.	Reino Unido
<i>Grifola frondosa</i> (maitake)	1	glucanas	C	?	↑	Shigesue <i>et al.</i> , 2000.	Japão
Dae-bang-poong-tang	15	-	C	O	↓	Joe <i>et al.</i> , 2001.	Coréia Sul
Hochu-ekki-to	10	-	C	O	= ↓	Hai le <i>et al.</i> , 2002.	Japão
Bizhongxiao	?	-	R	?	↓	Liang <i>et al.</i> , 2002.	China
PG201	12	-	C	O	↓	Shin <i>et al.</i> , 2003.	Coréia

Nº = nº de plantas do preparado; A= tipo de cobaia: C= camundongo (DBA1/J), R= rato (Lewis, Wistar, Sprague-Dawley, Agouti pretos, SD); Via= via de inoculação: i.p.= intraperitoneal; O= oral; Sev.= severidade da CIA após tratamento: ↑= aumentada, ↓= diminuída; País= onde se realizaram os experimentos.

Tabela 1b - Estudos publicados sobre possíveis propriedades farmacológicas anti-ártricas de extratos ou substâncias derivadas de plantas que utilizaram o modelo experimental CIA (conclusão).

Planta ou preparado	Nº	Substância(s)	A	Via	Sev.	Referência	País
<i>Arnebia hispidissima</i>	1	arnebinona	C	?	↓	Singh B <i>et al.</i> , 2003.	Índia
<i>Cheanomeles speciosa</i>	1	glicosídeos	R	O	↓	Chen & Wei., 2003.	China
<i>Stephania tetrandra</i> (Fun-boi)	1	-	C	O	↓	Niizawa <i>et al.</i> , 2003.	Japão
<i>Phellinus linteus</i> (cogumelo)	1	proteoglicanas	C	O	↓	Kim <i>et al.</i> , 2003.	Coréia Sul
Qing-Luo-Yin	4	-	R	O	↓	Li <i>et al.</i> , 2003.	China
<i>Pterodon pubescens</i>	1	-	C	O	↓	Coelho <i>et al.</i> , 2004..	Brasil
<i>Cheanomeles speciosa</i>	1	glicosídeos	C	?	↓	Zhang <i>et al.</i> , 2004.	China
<i>Tripterygium wilfordii</i>	1	glicosídeos	C	?	↓	Zhang <i>et al.</i> , 2004.	China
Dai-bofu-to	?	-	C	?	↓	Inoue <i>et al.</i> , 2004.	Japão
Bizhongxiao	?	-	R	?	↓	Wang <i>et al.</i> , 2004.	China
<i>Baccharis genistelloides</i>	1	-	C	O	↓	Coelho <i>et al.</i> , 2004.	Brasil
Kanzo-bushi-to (TJS-038)	?	-	C	?	↓	Ono <i>et al.</i> , 2004.	Japão
<i>Artocarpus tonkinensis</i>	1	-	R	i.p.	↓	Ngoc <i>et al.</i> , 2005.	Suécia
AIF	3	-	C	O	↓	Chang <i>et al.</i> , 2005.	Coréia
<i>Paeonia lactiflora</i>	1	glicosídeos	R	O	↓	Zhu <i>et al.</i> , 2005.	China
<i>Ulmus davidiana</i>	1	-	C	O	↓	Kim <i>et al. J.</i> , 2005.	Coréia
<i>Terminalia chebula</i>	1	ac. chebulagico	C	i.p.	↓	Lee <i>et al.</i> , 2005.	Coréia

Nº = nº de plantas do preparado; A= tipo de cobaia: C= camundongo (DBA1/J), R= rato (Lewis, Wistar, Sprague-Dawley, Agouti pretos, SD); Via= via de inoculação: i.p.=intraperitoneal, O= oral; Sev.= severidade da CIA após tratamento:↑= aumentada, ↓= diminuída; País onde se realizaram os experimentos.

MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

O termo medicamento fitoterápico, também referido freqüentemente como fitomedicamento (Siani, 2003), refere-se a preparações padronizadas de plantas medicinais consistindo de misturas complexas de uma ou mais plantas contendo, como ingredientes ativos, substâncias ou partes de planta na forma de extrato bruto ou processado (Calixto, 2000). De acordo com a definição proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os medicamentos fitoterápicos são substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado (Akerlele, 1993; OMS, 1993).

Os fitoterápicos são registrados como medicamento, remédios tradicionais ou suplementos dietéticos, de acordo com a legislação vigente em cada país e com suas tradições culturais (Petrovick *et al.*, 1999; Calixto, 2000; Chang, 2000). No Brasil, o Ministério da Saúde regulamenta a legislação pertinente a fitoterápicos através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Siani, 2003). A Resolução no. 48, de 16 de março de 2004, que normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos, define fitoterápico como medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância da sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos de fase III. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (ANVISA, 2004). Desta forma, fitofármacos são moléculas puras obtidas de plantas (Yunes *et al.*, 2001).

O uso de plantas como medicamento vem desde a antiguidade, onde o homem procurava na natureza plantas que fossem capazes de aliviar seus sofrimentos físicos e psíquicos e curar suas doenças (Phillipson, 2001). Atualmente, de acordo com dados da OMS, por causa da pobreza e falta de acesso à medicina moderna, cerca de 65 a 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas como atendimento primário da saúde (Akerlele, 1993). A OMS estimula o uso de plantas medicinais pela

população de países pobres, embora recomende cuidados especiais no seu uso. Além disso, distribui manuais para orientar estudos científicos que confirmem sua segurança e eficácia clínica (Calixto, 2001, OMS, 1993).

As vantagens dos fitoterápicos que atualmente justificam seu uso são: *efeitos sinérgicos*, pois as plantas possuem vários compostos com efeitos similares, aumentando o efeito destes, tal ação sinérgica através do mesmo mecanismo de ação ou por mecanismos diferentes; associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes; o menor custo em pesquisas (Yunes et al., 2001) e ao contrário dos medicamentos sintéticos, os fitoterápicos são geralmente utilizados pela população nos tratamentos crônicos, por serem melhor tolerados e por possuírem, via de regra (mas não necessariamente), menos efeitos colaterais (Calixto, 2001), devido à reduzida concentração de compostos ativos presentes nas plantas. Entretanto, a correlação dose-tempo (não dose-efeito) dos fitoterápicos ainda não está delineada.

Os produtos naturais também são usados como matérias-primas para a síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico e, principalmente, como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos pelas grandes indústrias, especialmente para o tratamento de enfermidades, onde as moléculas obtidas por síntese orgânica não têm revelado sucesso (Editorial The Lancet, 1994; Lawrence, 1999). Contribui para isso o advento de técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia de extração líquido-líquido, que permite eficiente e minucioso isolamento de compostos, bem como técnicas espectroscópicas para elucidação de estruturas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia de Massas (MS) e difração de Raios X (Hamburger & Hostettman, 1991).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% das plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais (Cragg *et al.*, 1997). Esse percentual é ainda mais elevado se considerarmos as drogas anticancerígenas e os antibióticos, no qual aproximadamente 70% foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (Shu, 1998).

Todos esses fatores têm redobrado o interesse das indústrias farmacêuticas para o aproveitamento da biodiversidade mundial, atualmente concentrada nos

países tropicais (Editorial The Lancet, 1994; Lawrence, 1999). Entretanto, a ameaça de extinção iminente de muitas espécies de plantas, especialmente nas áreas tropicais, torna urgente que cientistas aprendam o máximo possível antes que velhos remédios sejam esquecidos ou que seu material bruto seja destruído (Nearing, 1985). Este processo requer a observação e registro de técnicas médicas, identificação de materiais da planta - funções características da etnofarmacologia – bem como investigação experimental de compostos e seus efeitos (Nearing, 1985).

Fatores importantes contribuem para o crescimento do mercado mundial de fitoterápicos, entre eles podem ser mencionadas: a preferência dos consumidores por terapias naturais; a preocupação em relação aos efeitos colaterais freqüentemente observados com medicamentos sintéticos e a crença de que os medicamentos fitoterápicos não possuem efeitos colaterais; o grande interesse em medicina alternativa; a preferência da população por medicina preventiva devido aumento da expectativa de vida; a tendência da população em acreditar que os medicamentos fitoterápicos podem ser efetivos nos tratamentos de doenças quando os medicamentos sintéticos têm falhado; a tendência para automedicação; aumento da qualidade, a eficácia e segurança comprovada de fitoterápicos; alto custo dos medicamentos sintéticos (Calixto, 2000).

Atualmente o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares (Yunes *et al.*, 2001). Na Europa, atinge cerca de US\$ 7 bilhões ao ano, sendo a Alemanha responsável por cerca de 50% desse total (Grünwald, 1995). Em 2003, os países europeus gastaram quase \$5 bilhões em fitoterápicos (De Smet, 2005). O mercado asiático é também muito expressivo, atingindo cerca de US\$ 4 bilhões (Borchers *et al.*, 2000). Contudo o maior crescimento ocorrido no mercado dos medicamentos fitoterápicos foi observado nos Estados Unidos, que saiu de um patamar inexpressivo em 1992, crescendo intensamente nos últimos anos e atingindo US\$ 3,2 bilhões em 1996 e cerca de US\$ 5 bilhões em 1999 (Blumenthal, 1999 a,b). O Brasil ocupa uma posição de destaque no mercado de medicamentos, estimada em cerca de US\$ 7 bilhões em 2001 (Siani, 2003). Isso coloca o país entre os 10 maiores mercados mundiais (Siani, 2003).

Para que um medicamento fitoterápico possa ser registrado e prescrito pela classe médica, ele precisa ser estudado cientificamente, seguindo os mesmos critérios utilizados para o desenvolvimento dos medicamentos sintéticos, visando

confirmar sua segurança e eficácia clínica. Assim, etapas como estudos farmacológicos pré-clínicos, estudos toxicológicos em animais (agudo e crônico), estudos clínicos (fase I, fase II, fase III), devem ser realizadas utilizando-se protocolos científicos rígidos, segundo critérios aceitos internacionalmente (Calixto, 2001). Apesar do vasto uso destes medicamentos em todo o mundo, poucos foram até o momento estudados cientificamente para a comprovação de sua eficácia clínica e para avaliação de sua segurança (De Smet, 1997; Wagner, 1999; Calixto, 2000; Chang, 2000). Neste contexto, faz-se necessário garantir o profissionalismo dos médicos, a qualidade, eficácia e segurança dos métodos de tratamento e dos produtos de fontes naturais ou de plantas disponíveis no mercado (Chan, 2003).

Os efeitos adversos devido à ingestão de fitoterápicos podem ser gerados por contaminantes como excesso de pesticidas, microorganismos e metais pesados nas plantas, crescimento da mesma em ambiente contaminado ou serem contaminadas durante coleta; substâncias químicas tóxicas devido à armazenagem em condições desfavoráveis ou erradas ou tratamento químico na armazenagem; e adulterações com drogas alopáticas relacionadas a falta de profissionalismo na fabricação do medicamento (Chan, 2003). Alguns desses fatores podem ser controlados pela implementação de Procedimentos Operacionais Padrão (POP) levando Boas Práticas de Agricultura (BPA), Boas Práticas de Laboratório (BPL), Boas Práticas de Fornecimento (BPF) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) para produção de fitoterápicos ou produtos de outras fontes naturais (Chan, 2003).

A OMS no documento “Estratégia da OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005” preconiza o desenvolvimento de políticas observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, uso racional e acesso à medicina tradicional (Ministério da Saúde, 2005, OMS, 2002). Portanto, vem estimulando o uso da Medicina Tradicional e Complementar/ Alternativa -MT/MCA - nos sistemas de saúde de todos os países de forma integrada às técnicas da medicina ocidental moderna. De acordo com essa iniciativa, o Ministro da Saúde, em 2004, criou um grupo de trabalho para formular a Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares – PMNPC (Ministério da Saúde, 2005). Entre os objetivos do PMNPC destaca-se a incorporação e implementação da MNPC no SUS, na perspectiva da prevenção de agravos e da promoção e recuperação da saúde, com ênfase na atenção básica, voltada para o cuidado continuado, humanizado e integral

em saúde (Ministério da Saúde, 2005). Tais sistemas e recursos envolvem abordagens que buscam estimular os mecanismos naturais de promoção e recuperação da saúde por meio de tecnologias eficazes, com ênfase na escuta acolhedora, no desenvolvimento do vínculo terapêutico e na integração do ser humano com o meio ambiente e a sociedade (Ministério da Saúde, 2005). Outros pontos compartilhados pelas diversas abordagens abrangidas nesse campo são a visão ampliada do processo saúde doença e a promoção global do cuidado humano, especialmente do autocuidado (Ministério da Saúde, 2005).

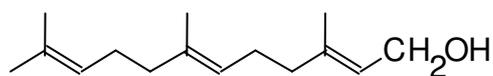
GÊNERO *Pterodon*

O gênero *Pterodon* pertence à família das Leguminosas – papilionáceas. Este gênero compreende 5 espécies nativas do Brasil: *Pterodon pubescens* Benth (Sucupira Branca), *Pterodon emarginatus* Vog., *Pterodon polygalaeflorus*, *Pterodon apparicioi* Pedersoli e *Pterodon abruptus* Benth (Fascio *et al.*, 1976). As árvores são originárias do Brasil, presentes em vários pontos do território, largamente dispersas nos cerrados, desde o Ceará (Serra do Araripe) até São Paulo, ocorrendo em abundância suficiente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo. É conhecida popularmente, conforme a região, como Faveira, Faveiro ou Sucupira Branca. A época de abundante frutificação é o mês de Agosto (Mors *et al.*, 1966).

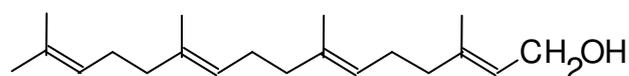
As formas farmacêuticas habituais utilizadas são infusões, decocções, extratos fluidos, tinturas, elixires, vinhos, xaropes, e outras formas a partir da casca, batata ou frutos. As aplicações terapêuticas descritas são: tratamento de reumatismo, da escrofulose, úlceras, dermatoses em geral e manifestações sifilíticas secundárias. É empregado como tônico contra a debilidade e fraqueza geral, e a casca é utilizada como anti-diabético (Coimbra, 1942; Cruz, 1965).

O estudo dos constituintes químico do óleo dos frutos e sementes deste gênero mostrou que seus compostos ativos são, basicamente, sesquiterpenos como o farnesol (I) (Mors *et al.*, 1966; Neto, 1976), diterpenos lineares como o geranilgeraniol (II) (Mors *et al.*, 1967; Dos Santos Filho *et al.*, 1972), e furano diterpenos com esqueleto vouacapano (III) e vinhaticano (IV) (Mahajan & Monteiro, 1970; Campos *et al.*, 1994; Arriaga *et al.*, 2000), alcalóides (V) (Braz-Filho *et al.*,

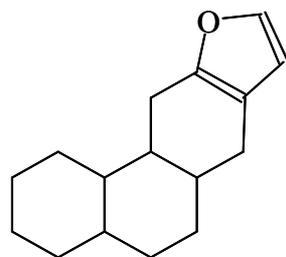
1971), flavonóides (Braz-Filho *et al.*, 1971) como, por exemplo, a taxifolina (VI) (Arriaga *et al.*, 2000).



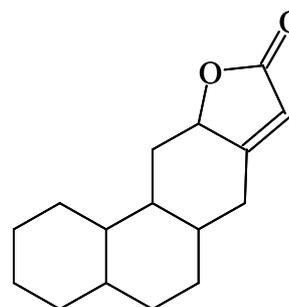
Farnesol (I)



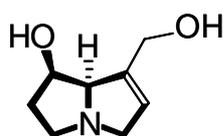
Geranylgeraniol (II)



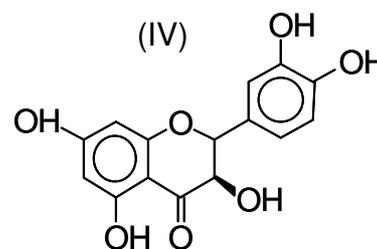
(III)



(IV)



(V)

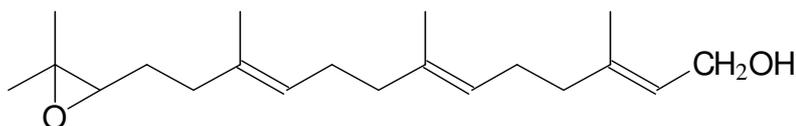


Taxifolina (VI)

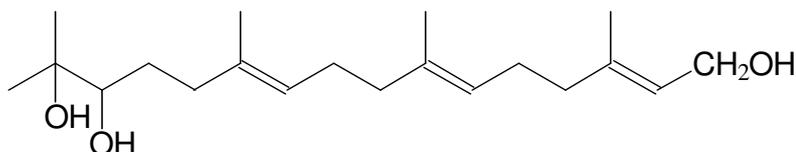
O extrato hexânico das sementes de *Pterodon emarginatus* Vog apresentou atividade anti-inflamatória similar ao anti-inflamatório não esteróide (AINE) em muitos modelos animais possivelmente relacionada à inibição da síntese de prostaglandinas e outros mediadores envolvidos no sistema de cininas (Carvalho *et al.* 1999).

Mors e colaboradores (1967) demonstraram que o óleo essencial dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth parece ser um agente quimioprolático eficiente em infecções por *Schistosoma mansoni*. Gilbert e colaboradores (1970) descreveram que esta ação devia-se à presença de sesqui e diterpenos presentes no óleo. Dos Santos Filho e colaboradores (1972) descreveram como responsáveis no óleo pela ação inibidora da penetração de cercarias de *S. mansoni* dois diterpenos, derivados oxigenados do geranylgeraniol: 14,15-epoxigeranylgeraniol (VII) e 14,15-dihidro-14,15-dihidroxigeranylgeraniol (VIII). Pesquisadores do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ/MG) desenvolveram diferentes formulações de sabonetes contendo óleo essencial de frutos de *Pterodon pubescens* que, dependendo da

formulação, apresentaram atividade quimioprolifática na Esquistossomose Mansonii (Santos Filho *et al.*, 1987; Katz *et al.*, 1993).



14,15-epoxigeranilgeraniol (VII)



14,15-dihidro-14,15-hidroxigeranilgeraniol (VIII)

Neto e colaboradores (1976) comprovaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo obtido de *Pterodon pubescens* Benth., em relação à inibição do crescimento de bactérias gram positivas como: *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*, *Bacillus* sp. e *Corynebacterium diphtheriae* sp..

Dias e colaboradores (1995) estudaram a genotoxicidade do óleo de *Pterodon pubescens* Benth., em ensaios realizados com ratos Wistar, concluindo que este não possui efeito clastogênico, ou seja, não induz um aumento significativo na frequência de aberrações cromossomiais. Sabino e colaboradores (1999a) testaram o óleo de sementes de *Pterodon pubescens* quanto a citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico humano, toxicidade aguda em camundongos machos da linhagem DBA/1J e atividade mutagênica. Este trabalho demonstrou que o óleo de *Pterodon pubescens* não apresenta atividade citotóxica, não é mutagênico nem tóxico, mesmo quando testado em doses muito maiores do que a população utiliza na medicina popular.

Frutos do gênero *Pterodon* são utilizados pela medicina popular sob a forma de infusão em vinho (extrato hidroalcoólico) devido às suas propriedades antiartríticas, analgésicas e antiinflamatórias (Penna, 1946; Correa, 1984). Sabino e colaboradores (1999b) demonstraram o efeito antiartrítico do extrato hidroalcoólico de frutos de *P. pubescens* testado no modelo de artrite induzido por colágeno tipo II (CIA) em camundongos DBA/1J.

Análise por cromatografia gás-líquido com espectrometria de massa (GC/MS) e ressonância magnética nuclear (NMR) revelaram entre os diversos constituintes do óleo da semente de Sucupira, derivados do vouacapan, o farnesol e o geranilgeranil como principais candidatos em mediar seus efeitos anti-inflamatórios (Silva *et al.* 2004).

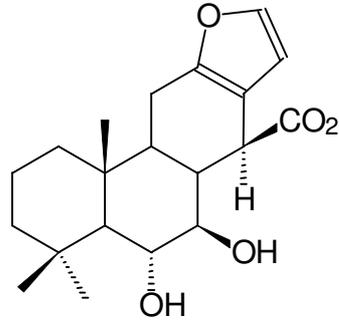
A análise por cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) do óleo de sementes de *P. pubescens*, extraído com etanol absoluto, permitiu visualizar três regiões distintas no cromatograma: de sesquiterpenos, de sesquiterpenos lineares e de diterpenos (Pinto-Coelho, 2001). Por extração líquido-líquido do óleo de sementes de *P. pubescens* com solventes de polaridade crescentes, foram obtidas 3 frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila, restando uma residual aquosa (Seara, 1997; Silva *et al.*, 2004). Pinto-Coelho e colaboradores (2001) demonstraram na fração hexânica a presença de vouacapan, geranilgeraniol e farnesol e na fração diclorometânica a presença de derivados do vouacapan (Coelho *et al.*, 2005). Coelho e colaboradores apresentaram atividade antinociceptiva nos modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético e de nocicepção induzida por formalina, com atividades superiores aos já conhecidos fármacos aspirina (AAS) e dipirona.

***Pterodon polygalaeflorus* Benth**

Na medicina popular brasileira, o extrato hidroalcoólico das sementes do gênero *Pterodon* são usados como anti-reumáticos, anti-inflamatórios (para dor de garganta) e preparações analgésicas (Fascio *et al.*, 1976). É importante destacar que sementes de *P. pubescens* e *P. polygalaeflorus* são similares, senão idênticas, e vendidas no mercado formal umas como as outras ou até com o nome errado de *Bowdichia major*, um outro tipo de Sucupira.

A comprovação do efeito antiinflamatório do óleo de frutos de *P. polygalaeflorus* foi atribuída a um furano diterpeno com esqueleto vouacapano, 6 α ,7 β -dihidrovouacapan-17 β -oato de metila (IX) (Nunan *et al.*, 1982), em modelo de edema de pata causado por carragenina. A esse composto também foi atribuída a atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e broncodilatadora (Leal *et al.*, 2000).

Vouacapan extraído de *P. polygalaeflorus* apresentou potente ação analgésica, provavelmente envolvendo um mecanismo opioidérgico central e periférico em modelos experimentais (Duarte *et al.*, 1992, Duarte *et al.*, 1996).



6 α ,7 β -dihidroxivouacapan- 17 β -oato (IX)

1 OBJETIVOS

Esta dissertação teve como objetivos:

- 1) Estudar possível interferência do extrato hidroalcoólico de *P. polygalaeiflorus* na distribuição de linfócitos T com fenótipo de memória em linfonodos de animais com Artrite Induzida por Colágeno (CIA);
- 2) Verificar se o tratamento com Sucupira interfere na mielopoiese esplênica induzida pela injeção de Adjuvante de Freud Completo (AFC) em camundongos da linhagem DBA1/J;
- 3) Confirmar o fenótipo granulocítico dessas células mielóides;
- 4) Avaliar uma eventual diferença entre o grau de ativação dessas células em animais primados com AFC tratados ou não com Sucupira;
- 5) Verificar se o tratamento com EHPp interfere com um segundo aumento de células mielóides esplênicas gerada pela injeção de colágeno tipo II no reforço para a indução da CIA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Nos experimentos de mielopoiese em baços de camundongos primados com AFC foram utilizados DBA/1J machos, de 4 a 6 meses de idade, peso corporal de cerca de 24 ± 2 gramas, grupos de 3 a 4 animais. No modelo experimental de CIA utilizou-se camundongos DBA/1J machos de 3 a 5 meses de idade, de 22 ± 3 gramas de peso corporal, grupos de 10 a 15 animais. Os camundongos foram adquiridos no Biotério do Departamento de Bioquímica da UERJ, onde foram mantidos sob temperatura controlada (20-25 °C), com ciclo de luz de 12 horas (6 às 18 horas) e com água e comida *ad libitum*. Os experimentos foram realizados seguindo as normas do Comitê de Ética em Experimentação de Animais.

2.2 Material Botânico

Sementes de *Pterodon polygalaeflorus* (Benth) foram coletadas por Renildo Fernandes Coelho à beira do córrego Bené em Pilar de Goiás, em Goiás. A identificação botânica da espécie foi realizada por Haroldo Cavalcante de Lima, no Departamento de Botânica Sistemática do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde uma amostra da espécie encontra-se depositada (RB 350278, julho 1999).

2.3 Equipamentos

- Agitador de tubo tipo Vórtex, modelo AP56 PHOENIX, Brasil;
- Balança analítica, modelo B200, Micronal, Brasil;
- Banho-maria, modelo 796, DE LEO, Brasil;
- Ultrapurificador de água modelo LV-308, Toraypure, Japão.

- Centrífuga refrigerada de mesa HERMLE Zentrifugen, modelo Z360K, Goesheim, Alemanha;
- Citômetro de fluxo modelo FACSCAN II, Becton Dickinson, EUA;
- Estufa tipo 294, De Leo & Cia Ltda, Brasil;
- Microscópio ótico de campo claro, modelo CBA, Olympus, Japão;
- Pletismômetro, modelo 7140, UGO-BASILE, Itália;

2.4 Reagentes

2.4.1 Para Citometria de Fluxo

Os reagentes anticorpos e sonda estão listados nas tabelas a seguir:

Quadro 1 – Anticorpos (Ac) e sonda utilizados nos experimentos de indução de mielopoiese em baços induzida por AFC.

Anticorpo	Empresa
Ac de rato anti-mouse CD32/16 não marcado (Fc Block) - Clone 9.3	Southern Biotechnology Associates, INC
Ac de rato anti-mouse CD11b (PE) – clone M1/70 (Integrin α_M chain, Mac-1 α chain)	BD Pharmingen
Sonda Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents	Molecular probes

Quadro 2a - Anticorpos utilizados nos experimentos de CIA (continua).

Anticorpos	Clone	Empresa
Rat anti-mouse CD32/16 não marcado (Fc Block)	9.3	Southern Biotechnology, INC
FITC rat anti-mouse CD4 (L3T4)	GK 1.5	Pharmingen

Quadro 2b - Anticorpos utilizados nos experimentos de CIA (conclusão).

RPE- rat anti-mouse CD4 (L3T4)	GK 1.5	Southern Biotechnology , INC
RPE rat anti-mouse CD8a	53-6.7	Southern Biotechnology, INC
CY-Chrome™ rat anti-mouse CD8a (Ly-2)	53-6.7	Pharmingen
PE rat anti-mouse CD11b (Integrin α_M chain, Mac-1 α chain)	M1/70	BD Pharmingen
FITC rat anti-mouse CD25	7D4	Southern Biotechnology, INC
PE rat anti-mouse CD28	37.51	Pharmingen
rat anti-mouse Pgp-1 (CD44) Quantum Red™ Conjugate	IM 7.8.1	Sigma immuno chemicals
PE rat anti-mouse CD45RB	16A (= C36316A)	Pharmingen
PE rat anti-mouse CD69	H1.2 F3	BD Pharmingen
Monoclonal anti-rat kappa and lambda light chains FITC conjugate	RT-39 + RL- 5	Sigma immuno chemicals
RPE rat anti-mouse L-selectin (Ly-22)	MEL-14	Pharmingen
Goat anti-rabbit IgG (whole molecule) FITC conjugate	----	Sigma immuno chemicals
Purified rat anti-mouse Ly-6G and Ly- 6C (Gr-1)	RB6-8C5	BD Pharmigen

2.4.2 Outros reagentes

- Adjuvante de Freund Completo (Sigma Chemical Co, EUA);
- Álcool Etílico Absoluto P.A. (Synth, Brasil);
- Meio de cultura RPMI 1640 (Gibco BRL, EUA);
- Soro Fetal Bovino inativado e estéril (Cultilab, Campinas, Brasil).

2.5 Material Especial

- Câmara de Neubauer (improved);
- Seringa de vidro para emulsificação do AFC em PBS ou em solução de colágeno tipo II;
- Sonda orogástrica.

2.6 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico de Sementes de *P. polygalaeflorus* (EHPp)

A quantidade de 25 g de sementes de *P. Polygalaeflorus* selecionadas, que estava armazenada sob refrigeração, foi mantida em baixa temperatura com nitrogênio líquido e imediatamente pulverizada, uma semente por vez, com pistilo em um gral nas mesmas condições de temperatura. A seguir, foi colocada em envelope de papel de filtro, e então, submersa em 250 mL de etanol 15% (em água destilada) em frasco de vidro âmbar cuja tampa foi coberta com papel alumínio na parte interna para que substâncias plásticas não contaminassem a extração. A extração realizou-se por 15 dias à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, tendo sido agitada moderadamente no 7º dia. Após este período de extração, retirou-se o envelope com as sementes pulverizadas maceradas, obtendo-se assim o extrato hidroalcoólico 15%. Este na concentração de 100 g/L (25 g de sementes em 250 mL de etanol 15%) foi diluído em concentrações de 20 g/L e 2 g/L em etanol 15%, aliquotado em tubos cônicos de 50 mL e mantido a -4°C até o momento da utilização.

Para o cálculo de rendimento, o volume de 10 mL de EHPp a 20 g p.s. de semente/L foi liofilizado. O peso seco do extrato obtido foi de 5,7 mg a partir de 0,2 g de peso seco de sementes, logo, 28,5 mg/1 g de peso seco de semente; rendimento de 2,85%.

2.7 Tratamento dos Camundongos DBA/1J com EHPp no Modelo de Mielopoiese em Baço Induzida por AFC e no Modelo CIA

A fim de tornar o tratamento dos camundongos o mais similar possível ao do humano, adaptou-se a dose de uso popular da Sucupira para tratamento de AR para a dose em camundongos para o estudo na CIA: trataram-se os animais oralmente, por gavagem, diariamente. A tabela a seguir apresenta as correlações.

Quadro 3 - Adaptação do uso popular da Sucupira em AR para estudo na CIA.

Medicina popular	Tratamento da CIA
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Um punhado (30-40 g) de sementes inteiras em garrafão de vinho (4,7 L); ▪ Curtir em lugar fresco e sombrio por ao menos duas semanas; ▪ Tomar doses antes das refeições (50-100 mL/dia); ▪ Dose/dia: extrato de 375-750 mg de p.s. de semente/indivíduo; ▪ Homem 75 kg: extrato de 5-10 mg p.s. semente/kg/dia; ▪ Posologia: > 2 semanas. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sementes pulverizadas a 10 g p.s. em 100 ml de etanol/água 15%; ▪ Extrair em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 dias; ▪ Administrar oralmente 50 µL/dia; ▪ Dose/dia: extrato de 1; 0,1 ou 0,01 mg de p. s. semente/animal; ▪ Camundongo peso corporal de 20 g: dose de 50, 5 ou 0,5 mg p.s. semente /kg/dia. ▪ Posologia: > 2 semanas.

As doses utilizadas foram o equivalente a 0,5; 5 e 50 mg/kg, administradas umas vez por dia. Ao se considerar que um camundongo tem em torno de 20 g, cada animal recebeu 0,01; 0,1 e 1 mg de semente no volume de 50µL uma vez ao dia de acordo com o grupo experimental pertencente.

2.8 Avaliação do Efeito do Extrato Hidroalcoólico de Sementes de *Pterodon polygalaeflorus* (EHPp) na Mielopoiese - Expansão da População de Células Mac-1⁺ (CD11b) - em Baços de Camundongos Primados com Adjuvante de Freund Completo (AFC)

2.8.1 Indução da Mielopoiese e Tratamento dos Animais

O esquema ilustrativo do experimento para avaliação da possível modulação por EHPp da mielopoiese (análise de células Mac-1⁺) induzida por AFC no baço é mostrado na figura 3.

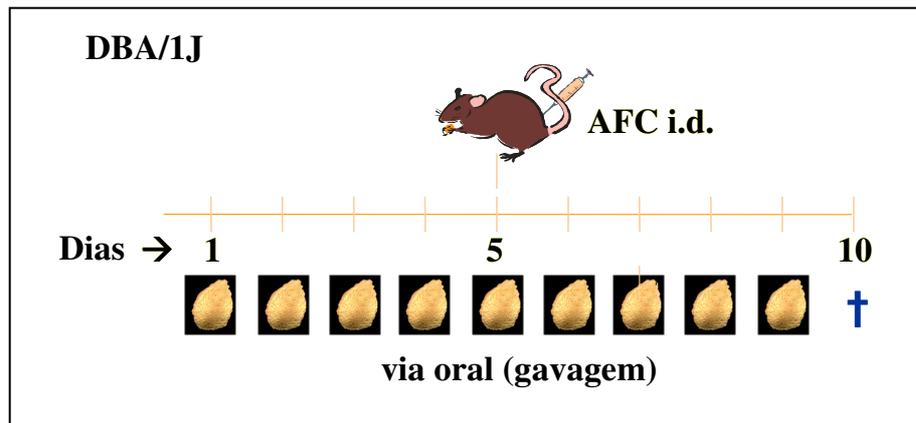


Figura 3 – Esquema ilustrativo do experimento para avaliação da possível modulação por EHPp da mielopoiese induzida por AFC no baço.

Administrou-se EHPp aos camundongos DBA/1J, machos, nas doses de 0,5; 5 e 50 mg/ kg, por gavagem, através de sonda orogástrica, no volume de 50 μ L, diariamente durante 9 dias. No 5^o dia de tratamento, foi injetado 100 μ L de AFC estéril emulsionado com PBS pH 7,4 (2:1, AFC:PBS), i.d., no dorso (base da cauda), no lado direito. No 10^o dia de experimento, os camundongos foram anestesiados em câmara saturada com éter etílico e, sob o efeito anestésico, sofreram deslocamento cervical. O baço foi retirado e lavado com PBS duas vezes e colocado em uma tela dentro de um béquer contendo 5 mL de meio RPMI suplementado com 5% de SFB.

Os baços foram cortados com tesoura e, com auxílio de bastão, os baços foram macerados dentro da tela adaptada para a técnica, formando uma suspensão de esplenócitos, a qual foi transferida para tubo cônico no volume total de 10 mL de meio RPMI com soro. Uma alíquota de células foi diluída em líquido de Turk, para que ocorresse hemólise, e contadas em câmara de Neubauer. O tubo foi mantido em gelo durante a contagem de células. Com intuito de tornar homogênea a análise das células do baço de cada grupo, juntou-se o número de 5×10^6 células de cada baço/animal, logo, por exemplo, em um grupo de 3 animais, juntou-se 5×10^6 células de cada baço, formando o total de 15×10^6 células do grupo. Deste total, 1×10^6 células foi retirado para a realização da marcação para citometria. A tabela 5 mostra os grupos estudados neste experimento.

Quadro 4 - Distribuição dos grupos de animais estudados no experimento de indução de mielopoiese em baços de camundongos primados com AFC e tratados com EHPp.

Sadio	- sem administração i.d. de AFC; - administração de 50 μ L de água destilada por gavagem.
Etanol	- sem administração i.d. de AFC; - administração de 50 μ L de etanol 15% (em água destilada) por gavagem.
EHPp 50 mg/kg	- sem administração i.d. de AFC; - administração de 50 μ L de 50 mg/kg por gavagem.
AFC + Água	- administração i.d. de AFC; - administração de 50 μ L de água destilada por gavagem.
AFC + Etanol 15%	- administração i.d. de AFC; - administração de 50 μ L de etanol 15% por gavagem.
AFC + EHPp 5 mg/kg	- administração i.d. de AFC; - administração de 50 μ L de 5 mg/kg por gavagem.
AFC + EHPp 0,5 mg/kg	- administração i.d. de AFC; - administração de 50 μ L de 0,5 mg/kg por gavagem.

2.8.2 Marcação de Células do Baço com Anticorpo Anti-CD11b Conjugado a Ficoeritrina (PE)

A fim de bloquear a ligação inespecífica ao receptor de fração cristalizada do anticorpo (FcR), preparou-se uma solução de anticorpo anti-CD32/16 que reconhece o FcR: adicionou-se 4 μL deste anticorpo (clone 9.3, 0,5 mg/mL, Southern Biotech.) em 196 μL de meio RPMI com SFB (volume total para 4 marcações; sendo realizada 3 marcações). Pipetou-se 50 μL da solução de anti-CD32/16 (0,5 μg por marcação) em cada tubo com 1×10^6 células em 100 μL de meio com SFB para cada grupo; tempo de incubação de 20 minutos, em gelo e ao abrigo da luz. Preparou-se, então, a solução do Ac anti-CD11b-PE, que reconhece células Mac-1⁺: adicionou-se 6 μL de anticorpo CD11b-PE anti-camundongo (clone M1/70, 0,2 mg/mL, BD Pharmigen) em 196 μL de meio RPMI com 5% SFB. Após o tempo de incubação com anti-CD32/16, pipetou-se 50 μL da solução com anti-CD11b-PE em cada tubo (0,3 μg por marcação); tempo de incubação de 30 minutos, com homogeneização aos 15 minutos, em gelo e ao abrigo da luz. Após incubação, adicionou-se 1 mL de meio 5% SFB. Centrifugou-se as células a 500 x g por 10 minutos sob refrigeração (4°C). Aspirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de meio com 5% SFB e repetiu-se a centrifugação. Por último, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio com soro. Em seguida realizou-se a análise das células em citometria de fluxo, isto é, as células analisadas neste experimento não foram fixadas com paraformaldeído.

2.8.3 Marcação Celular com Sonda para Identificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

A quantidade de 1×10^6 células do baço em 100 μL de solução de Hanks foi marcada com a sonda para identificação de EROS na concentração final de 2 μM , durante 50 minutos, a temperatura ambiente conforme informações técnicas do produto. Após, adicionou-se 1 mL de solução de Hanks e centrifugou-se as células a 500 x g por 10 minutos sob refrigeração (4°C) por duas vezes. Em seguida, após

retirar o sobrenadante, as células foram bloqueadas para ligação inespecífica ao receptor Fc e marcadas com anticorpo anti-CD11b conforme procedimento descrito no item acima. Nesta marcação, as células foram fixadas em formaldeído a 1% e analisadas em citometria de fluxo posteriormente.

2.9 Estudo do Efeito Anti-artrítico do Extrato Hidroalcoólico de Sementes de *Pterodon polygalaeflorus* (EHPp)

2.9.1 Indução de Artrite Induzida por Colágeno tipo II (CIA) em Camundongos DBA/1J

A CIA foi induzida segundo esquema da figura 4, com CII purificado de cartilagem do esterno de galináceo (Lima *et al.*, 1999). O CII era dissolvido em ácido acético 0,05 M, na concentração de 6 mg/mL. No dia 0 da imunização, camundongos DBA/1J machos adultos receberam colágeno tipo II (200 µg) em ácido acético 0,05 M emulsionado em AFC estéril na proporção 1:2 (v/v) i.d. no dorso (base da cauda) no volume de 100 µl conforme Wooley e colaboradores (1981). No 21º dia, os camundongos receberam uma dose reforço de antígeno - 400 µg de CII em ácido acético 0,05 M, no volume de 100 µL, i.p.. E neste mesmo dia iniciou-se o tratamento.

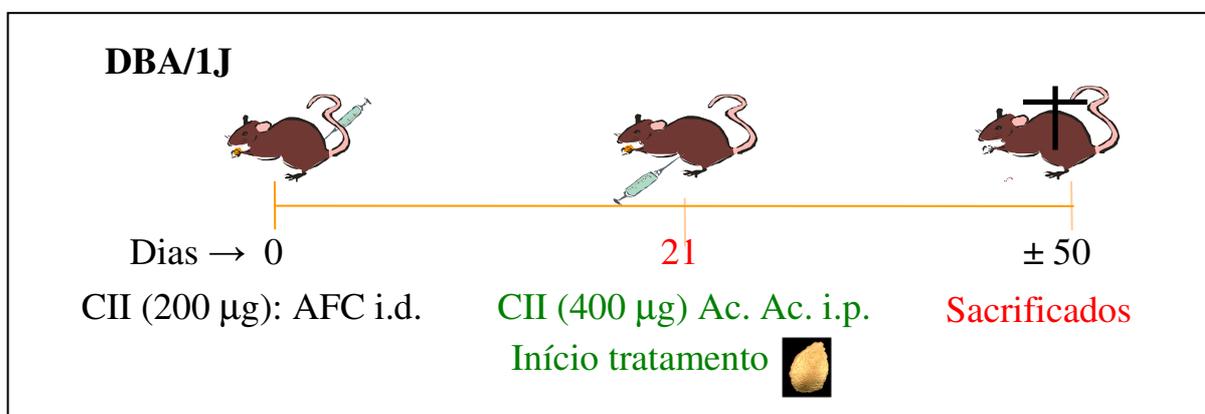


Figura 4 – Esquema ilustrativo do experimento de indução de artrite (CIA) em camundongos DBA/1J tratados com EHPp.

O tratamento foi realizado por gavagem através de sonda orogástrica, no volume de 50 µL, diariamente, durante cerca de 30 dias, exceto aos domingos. As doses administradas de EHPp foram de 5 e 0,5 mg/kg p.c..

Para este estudo os animais foram distribuídos em grupos formados conforme apresentado no quadro 5.

Quadro 5 – Distribuição dos animais em grupos para estudo do experimento de indução da CIA e tratamento com EHPp.

Sadios	- não foi injetado CII i.d. e i.p., isto é, sem indução da CIA; - administração de 50 µL de etanol 15% (veículo)/ dia por gavagem.
CIA + Veículo	- sofreram indução da CIA; - administração de 50 µL de etanol 15%/ dia por gavagem.
CIA + EHPp 5 mg/kg	- sofreram indução de CIA; - administração de 50 µL de 5 mg/kg p.c./ dia por gavagem.
CIA + EHPp 0,5 mg/kg	- sofreram indução de CIA; - administração de 50 µL de 0,5 mg/kg p.c./ dia por gavagem.

2.9.2 Avaliação Clínica da CIA

A medida do volume das patas direita e esquerda posteriores dos camundongos foram monitoradas utilizando um pletismômetro (Gu & Brandwein, 1998). Cada pata foi submersa em uma célula contendo 0,05% de NaCl e 0,3% (v/v) do reagente BBC97, fornecido pelo fabricante (Ornano, Itália), conectada através de um transdutor a um processador digital, o qual detecta diferenças no nível do líquido causada pelo deslocamento de volume. Logo, o volume de líquido deslocado pela

pata foi considerado como volume da pata para o cálculo dos índices de aumento da mesma.

Os volumes medidos para as patas traseiras em dias definidos foram comparados com os volumes medidos nessas patas no dia 0, fornecendo um índice de edema (i.e., percentual de inchação ou retração) para cada animal. Os índices de edema individual foram agrupados para calcular o índice médio \pm DP de cada grupo (n= 10-15) em dias definidos para medida da severidade da artrite.

2.9.3 Retirada e Preparação de Linfonodos para Análise em Citômetro de Fluxo

Ao final do experimento, os camundongos foram anestesiados em câmara saturada com éter etílico e sob o efeito anestésico sofreram deslocamento cervical. Os dois linfonodos inguinais e os dois linfonodos poplíteos das patas traseiras de cada camundongo foram retirados e reunidos em um eppendorf por camundongo, com 0,5 mL de meio RPMI com 5% de SFB e 2 mM de glutamina. Em seguida, cortou-se os linfonodos com tesoura e os pedaços foram macerados com uma ponteira de plástico azul (1 mL) fechada na ponta. Transferiu-se as células para um tubo cônico com 10 mL de meio com 5% de SFB e 2 mM de glutamina para cada animal. Uma alíquota de células foi diluída em líquido de Turk, para que ocorresse a hemólise, e contadas em câmara de Neubauer. O tubo foi mantido em gelo durante a contagem de células. Com intuito de tornar homogênea a análise das células dos linfonodos de cada grupo, juntou-se o número de 5×10^6 células de cada animal (*pool* de células dos linfonodos= 2 poplíteos + 2 inguinais/animal), logo, por exemplo, em um grupo de 10 animais, juntou-se 5×10^6 células de cada animal (n=10), formando o total de 50×10^6 células do grupo. Deste total, $1,5 \times 10^6$ células (amostra homogênea do grupo) foi retirado para a realização da marcação tripla para análise citofluorimétrica.

2.9.4 Marcação de Linfócitos de LN para Análise em Citômetro de Fluxo

Para a marcação com os distintos anticorpos fluorocromados, células de linfonodos de cada grupo, na quantidade de $1,5 \times 10^6$ em 100 μL de meio com 5% de SFB, foram inicialmente incubadas com anticorpo anti-CD16/32 (0,75 μg / marcação) por 20 minutos para bloquear a ligação inespecífica por receptor Fc, em gelo e ao abrigo da luz durante toda a marcação. Em seqüência, realizou-se a marcação com três anticorpos com fluorocromos diferentes (marcação tripla). Soluções de cada anticorpo em meio RPMI com 5% de SFB foram adicionadas, no volume de 50 μL cada, às células. A tabela 7 apresenta as 6 marcações triplas realizadas, mostrando os anticorpos com seus respectivos fluorocromos e quantidade por marcação utilizada, salientando que todas as marcações foram aplicadas a cada grupo de animal estudado.

Quadro 6 – Marcações triplas realizadas em células de linfonodos de animais com CIA tratados ou não com EHPp.

Fluorocromos			
	FITC	PE	Cy/ QR
Anticorpo anti-CD	CD4 (0,75 μg / marcação)	CD69 (0,72 μg / marcação)	CD8 (0,38 μg / marcação)
	CD4 (0,75 μg / marcação)	L-selectina (0,3 μg / marcação)	CD8 (0,38 μg / marcação)
	CD4 (0,75 μg / marcação)	CD8 (0,5 μg / marcação)	CD44 (50 μL 1:50/ marcação)
	CD25 (0,75 μg / marcação)	CD4 (0,6 μg / marcação)	CD8 (0,38 μg / marcação)
	CD4 (0,75 μg / marcação)	CD45RB (0,6 μg / marcação)	CD8 (0,38 μg / marcação)
	CD4 (0,75 μg / marcação)	CD28 (0,72 μg / marcação)	CD8 (0,38 μg / marcação)

Decorridos 30 minutos de incubação, adicionou-se 1 mL de meio 5% SFB, centrifugou-se a 500 x g por 3 minutos a 4°C, aspirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de meio com SFB e repetiu-se a centrifugação. Por último, ressuspendeu-se as células em 1 mL de solução de paraformaldeído 1,5% em tampão Hanks para fixação das células. A análise em Citometria de Fluxo foi realizada em menos de 4 dias após a fixação.

2.9.5 Retirada e Preparação de Baços para Análise em Citômetro de Fluxo

O baço foi retirado e lavado com PBS por duas vezes e colocado em um suporte com tela dentro de um béquer contendo 5 mL de meio RPMI suplementado com 5 % de SFB. Cortaram-se os baços com tesoura e, com auxílio de bastão, os baços foram macerados dentro de uma tela adaptada para a técnica, formando uma suspensão de células, a qual foi transferida para tubo cônico no volume total de 10 mL de meio RPMI com soro. Uma alíquota de células foi diluída em líquido de Turk, para que ocorresse a hemólise, e contadas em câmara de Neubauer. O tubo foi mantido em gelo durante a contagem de células. Com intuito de tornar homogênea a análise das células do baço de cada grupo, juntou-se o número de 5×10^6 células de cada baço/animal, logo, por exemplo, em um grupo de 5 animais, juntou-se 5×10^6 células de cada baço formando o total de 25×10^6 células do grupo. Deste total, 2×10^6 células foram retiradas para a realização da marcação para citometria.

2.9.6 Marcação de Células do Baço para Análise em Citômetro de Fluxo

Para a marcação com os diferentes anticorpos fluorocromados, células do baço de cada grupo, na quantidade de 2×10^6 em 100 μ L de meio com 5% de SFB, foram inicialmente incubadas com anticorpo anti-CD16/32 (0,75 μ g/ marcação) por 20 minutos para bloquear a ligação inespecífica ao receptor Fc, foram mantidas em gelo e ao abrigo da luz durante toda a marcação. Após o tempo de incubação com

anti-CD32/16, pipetou-se 50 μ L da solução com anti-CD11b-PE em cada tubo (0,3 μ g/ marcação); tempo de incubação de 30 minutos, com homogeneização aos 15 minutos, em gelo e ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação, adicionou-se 1 mL de meio contendo 5% SFB. Centrifugou-se a 500 x g por 10 minutos sob refrigeração (4°C). Aspirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de meio com 5% SFB e repetiu-se a centrifugação. Por último, ressuspendeu-se as células em 1 mL de solução de paraformaldeído 1,5% em tampão Hanks para fixação das células. As leituras foram realizadas em menos de 4 dias após fixação.

Decorrido o bloqueio da ligação inespecífica ao receptor Fc, outra marcação celular foi realizada utilizando o anticorpo não marcado anti-Gr.1 na quantidade de 1,6 μ g por marcação, no volume de 50 μ L. Após 30 minutos de incubação, centrifugou-se as células a 500 x g por 10 minutos sob refrigeração (4°C), por duas vezes. O sobrenadante foi aspirado. Adicionou-se 100 μ L de meio de cultura e 50 μ L de anticorpo monoclonal anti-cadeias leves kappa e lambda de anticorpos de rato conjugados a FITC, na diluição de 1:50, em meio de cultura RPMI com 5% de soro. Transcorridos 30 minutos, centrifugou-se as células novamente a 500 x g por 10 minutos sob refrigeração (4°C), por duas vezes. Incubou-se as células com anticorpo anti-CD11b PE (0,6 μ g/ marcação) por mais 30 minutos. Mais uma vez, as células foram centrifugadas 500 x g por 10 minutos sob refrigeração (4°C) e ressuspensas com 1 mL de solução de paraformaldeído 1,5% em tampão Hanks para fixação das células. A análise por Citometria de Fluxo foi realizada em menos de 4 dias após fixação.

2.10 Análises no Citômetro de Fluxo

Para o cálculo do valor absoluto de cada subpopulação (CD4, CD8, DN) os percentuais de cada subpopulação no citograma (CD4 x CD8; marcação dupla) foram multiplicados pelo número absoluto médio de células contadas por linfonodo (LN). Para o cálculo do valor absoluto de células CD69+, Lselec -/low, ou CD45RB high, os percentuais de cada subpopulação no citograma (CD4x CD8) foram

multiplicados pelos percentuais destas subpopulações e pelo número absoluto médio de células contadas por LN.

As análises foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCALIBUR (Becton Dickinson) equipado com um laser de 488nm de íon argônio de 15 mW. A fluorescência verde emitida pelo FITC foi detectada após a passagem através de um filtro de passagem de banda de 530nm, a emissão laranja do PE após a passagem através do filtro de banda 585nm e a emissão vermelha do Cychrome (PE-CY5) após passagem através do filtro de banda longa acima de 650nm. Ajustes dinâmicos da compensação eletrônica entre essas leituras de canais foram realizados para remover a superposição de emissões espectrais. Análises foram obtidas com o programa Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

2.11 Análise Estatística

Os resultados foram analisados através do Testes ANOVA seguido de Tukey, para um nível de significância de * $p < 0,05$ (Dawson-Saunders & Trapp, 1994), utilizando o programa GraphPad InStat versão 3.0 (GraphPad Software, Inc).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito Anti-artrítico do Extrato Hidroalcoólico de Sementes de *Pterodon polygalaeflorus*

Com a finalidade de estudarmos o efeito anti-artrítico do extrato hidroalcoólico de *Pterodon polygalaeflorus* (EHPp), camundongos machos da linhagem DBA/1J sofreram indução de artrite pela administração de colágeno tipo II (CII). Os animais foram primados por via intradérmica, no dorso, com 200 µg de CII emulsionado em AFC. Após 21 dias, administrou-se uma dose reforço do antígeno CII para estimular a resposta imune: 400 µg de CII intraperitonealmente. Neste mesmo dia, 21^º, o tratamento foi iniciado e mantido até o dia anterior ao de sacrificar os animais (47^º dia). Os camundongos expostos à indução da CIA foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg (grupo EHPp). Os grupos controles deste estudo foram: camundongos que receberam o veículo etanol 15% e sofreram a indução da artrite (grupo CIA) e animais tratados com veículo etanol 15% sem a indução da doença (grupo sadio). Veículo ou EHPp (50 µL) foram administrados diariamente, exceto domingo, por via oral (por gavagem).

A primeira técnica utilizada para verificar a evolução do processo inflamatório foi a medida do volume das patas posteriores direita e esquerda dos animais realizada no Pletismômetro em dias definidos. Os valores foram comparados ao volume medido nessas patas antes de iniciar a indução da CIA, no dia 0. As diferenças foram expressas em índice de edema (i.e., percentual de inchaço ou retração) para cada animal. Os índices de edema individual foram agrupados para calcular o índice médio \pm DP de cada grupo em dias definidos para medida da severidade da artrite.

O gráfico 1 apresenta o índice de edema das patas dos animais ao longo do período determinado para o experimento – 47 dias. Nos animais que sofreram indução da CIA, o edema de pata teve início pelo 24^º dia de experimento, apresentando o maior índice pelo 38^º dia de experimento. Após, as patas edemaciadas diminuíram de volume por estarem em um estágio avançado da

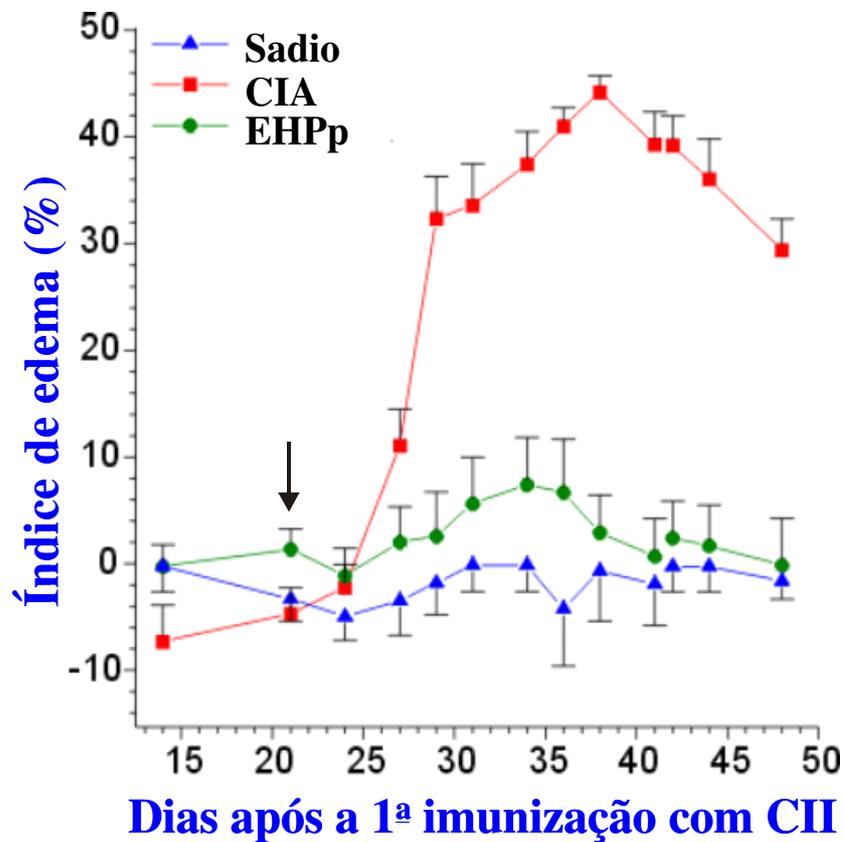


Gráfico 1. Efeito terapêutico do EHPp em camundongos com CIA. Camundongos DBA/1J machos foram divididos em três grupos: sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA – animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA); EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. Volumes das patas posteriores direita e esquerda foram medidas em Pletismômetro em dias definidos e comparadas ao volume medido nessas patas no dia 0. As diferenças foram expressas em índice de edema para cada animal. Os índices de edema individual foram agrupados para calcular o índice médio \pm DP de cada grupo em dias definidos para medida da severidade da artrite. Grupos de 10 a 15 animais. Diferenças entre animais com CIA e com CIA tratados com EHPp foram significantes a partir do dia 29 ($p < 0.001$) (ANOVA e Tukey).

doença, mais severo, no qual as patas desenvolvem anquilose, isto é, perda total da mobilidade articular por fusão dos ossos que formam a articulação.

A administração oral de EHPp reduziu o edema de pata induzido por CII. O tratamento diário, iniciado no dia da dose reforço de CII (i.p.) - 21^o dia de experimento- e terminado um dia antes de sacrificar os animais, inibiu significativamente o desenvolvimento da CIA durante todo o tempo do experimento, mostrando índices de edema próximos ao dos animais sadios.

A figura 5 exibe, à esquerda, pata posterior edemaciada e hiperemiada de um animal do grupo CIA tratado com veículo. À direita, animal com indução de CIA tratado com EHPp (0,5 mg/kg) exibindo pata sem edema ou eritema, com volume próximo ao do grupo controle.

A figura 6 ilustra o efeito do EHPp sobre o tamanho de linfonodos inguinais e poplíteos em camundongo que sofreu indução de CIA. Percebe-se que os linfonodos (LNs) do camundongo com indução de CIA tratado com veículo apresentou um aumento expressivo no tamanho quando comparado aos LNs do camundongo tratado com EHPp.

O número total de células nos LNs inguinais foi significativamente diferente entre os grupos ($p < 0,001$) (gráfico 2). A CIA aumentou cerca de duas vezes o valor absoluto de células no LN inguinal dos camundongos tratados com veículo em relação aos sadios. Enquanto que os camundongos com indução de CIA tratados com EHPp apresentaram um aumento menos expressivo no número de células em relação ao número de células dos animais com CIA. Ao compararmos com os sadios, o número de células dos animais com CIA tratados com EHPp foi cerca de 1/3 maior.

Para a análise fenotípica das subpopulações de linfócitos nos linfonodos inguinais, realizou-se a marcação destas com anticorpos fluorocromados para diferentes marcadores de superfície para posterior análise em Citômetro de Fluxo. Inicialmente, apresentamos as marcações com anticorpo anti-CD4 e anti-CD8. As percentagens das subpopulações linfocitárias: T CD4⁺, T CD8⁺ e células duplo negativas (DN; 90% linfócitos B) nos grupos sadios, CIA, EHPp (0,5 mg/kg) estão apresentadas no gráfico 3. Quando se analisa o número relativo (%) de células de cada subpopulação (CD4, CD8 ou DN) nos diferentes grupos, observa-se que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos.

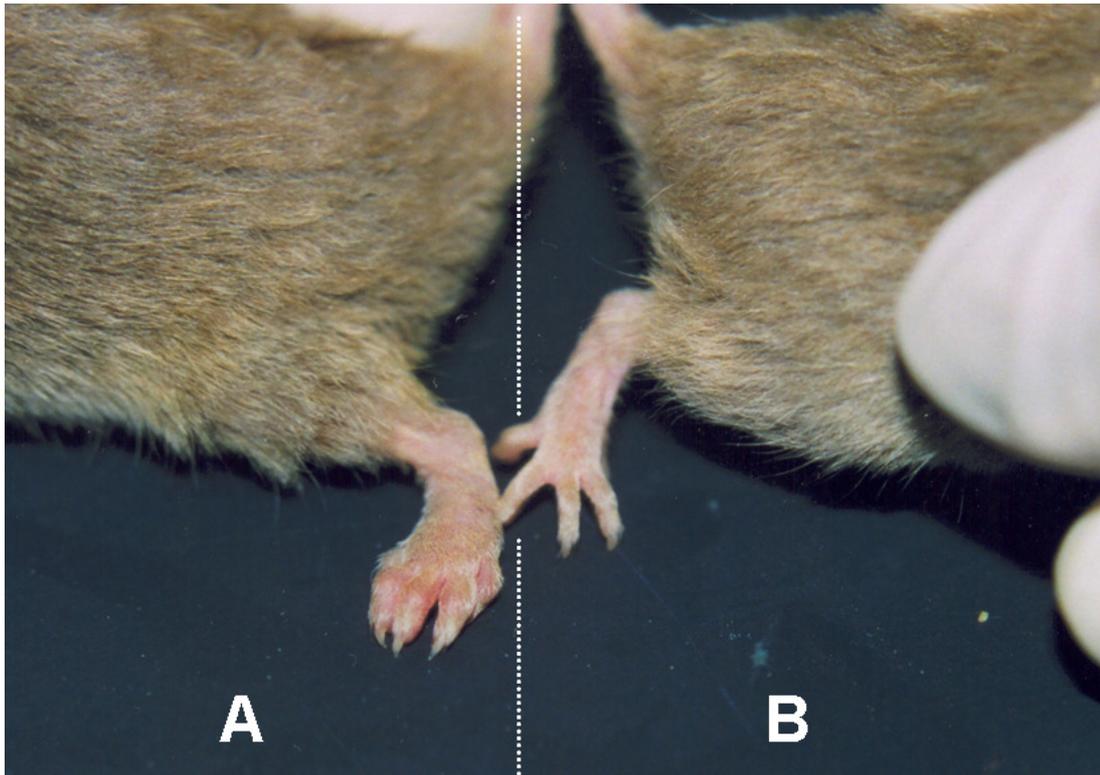


Figura 5. Efeito do EHPp sobre o edema de patas na CIA. Patas posteriores de camundongos DBA/1J machos. (A) Animal com CIA tratado com veículo apresenta edema e hiperemia na pata. (B) Animal com indução de CIA tratado com EHPp (dose de 0,5 mg/kg) exibindo pata sem edema.

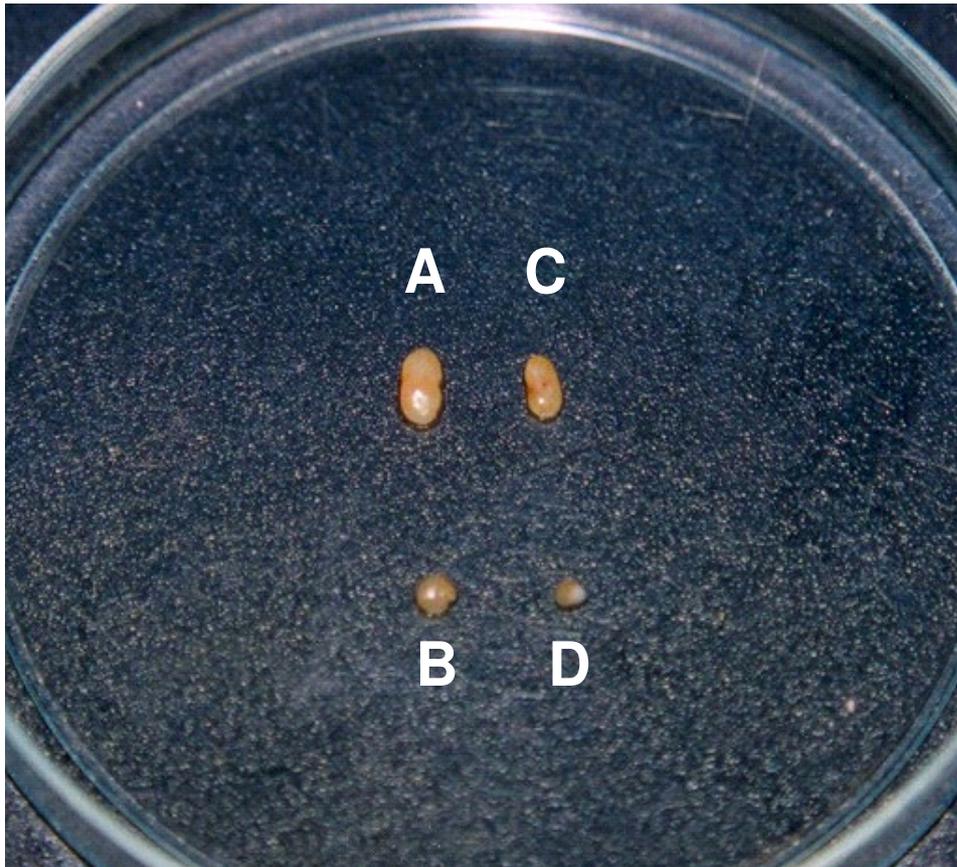


Figura 6. Efeito do EHPp sobre o tamanho de linfonodos de camundongos que sofreram indução de CIA. Linfonodos inguinal (A) e poplíteo (B) de animais com CIA; Linfonodos inguinal (C) e poplíteo (D) de animais com indução de CIA tratados com EHPp (0,5 mg/kg).

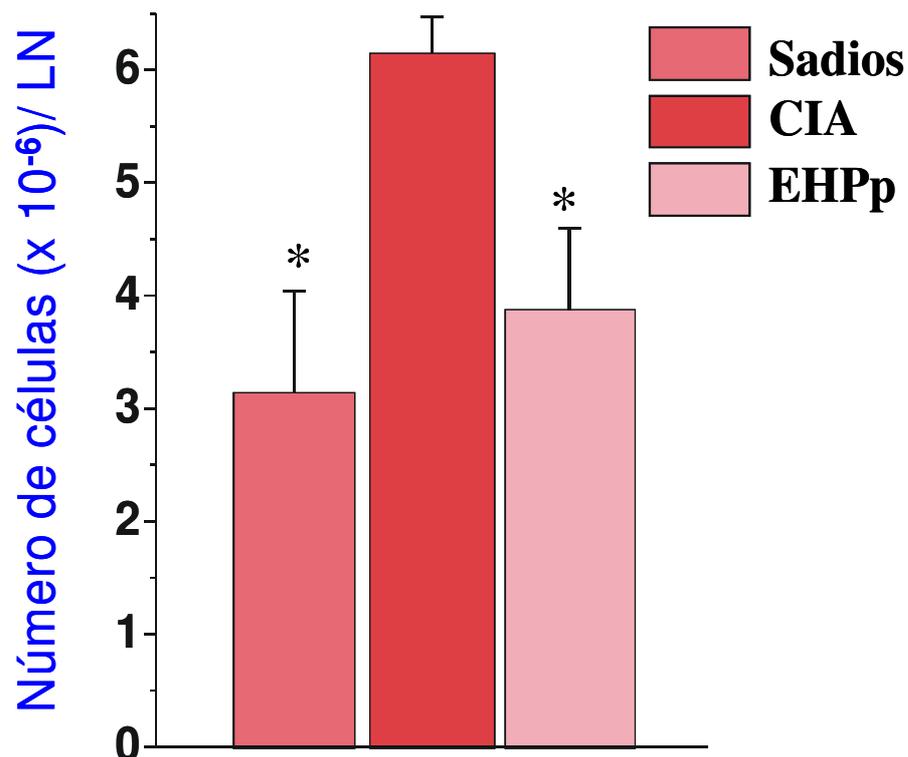


Gráfico 2. Número absoluto de células nos linfonodos inguinais. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA – animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. Resultados representam: média \pm D.P. de 2 experimentos independentes utilizando “pool” de células de LN inguinal. * $P < 0,001$ em relação ao grupo CIA (ANOVA e Tukey).

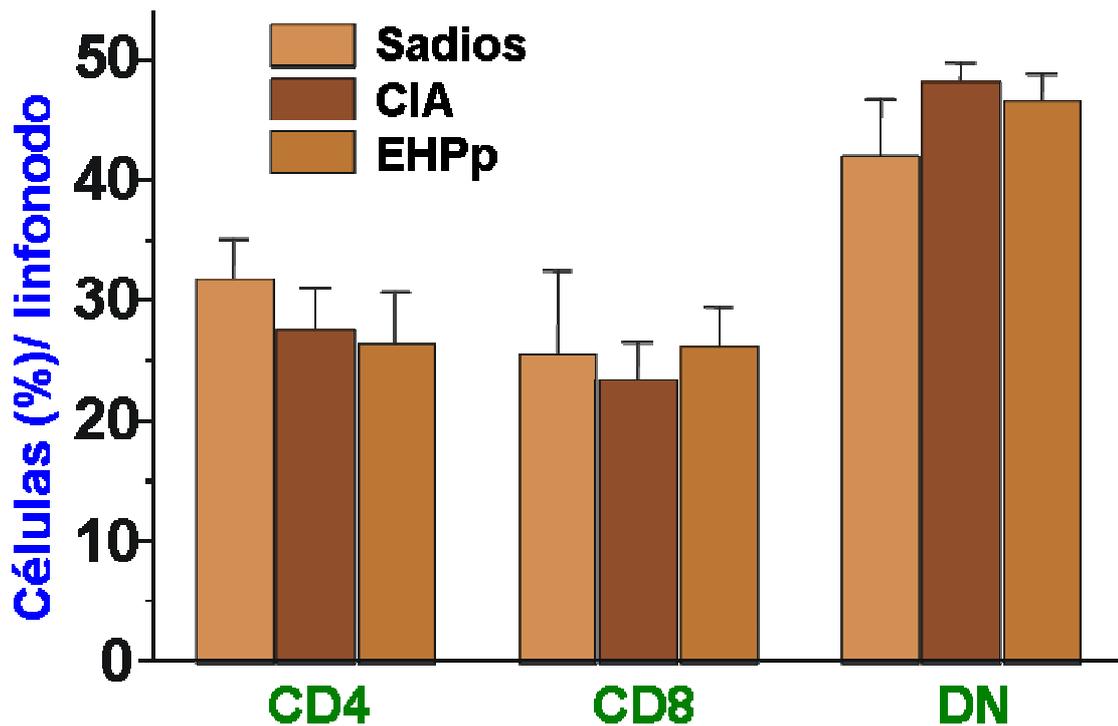


Gráfico 3. Efeito do EHPp no número relativo das subpopulações de linfócitos nos linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA –animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. As células dos linfonodos foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 fluorocromados para análise em Citometria de Fluxo. Resultados representam: média \pm D.P. de 2 experimentos independentes utilizando “pool” de células de linfonodos inguinais. $P > 0,05$ entre os grupos para todas as subpopulações (ANOVA).

Entretanto, o número absoluto de linfócitos de cada subpopulação nos linfonodos, obtido pela multiplicação do número médio de células do LN pela percentagem de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ ou células DN, indica uma diferença significativa entre alguns grupos (gráfico 4). O número de linfócitos T CD4⁺ do grupo com artrite apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos sadios e tratados com EHPp. O número total de linfócitos T CD4⁺ não diferiu entre os animais sadios e os tratados com EHPp. Por outro lado, o número total de linfócitos T CD8⁺ e DN apresentaram diferença significativa entre todos os grupos, havendo um maior número destas duas subpopulações no grupo de animais com CIA.

Com o intuito de verificar a reprodutibilidade do procedimento de marcação das células com anticorpos, as percentagens das subpopulações de linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e células DN identificadas nas marcações triplas de linfonodos de camundongos sadios de dois experimentos independentes foram comparadas (gráfico 5).

Não foi observada diferença significativa entre os dois experimentos nos percentuais de cada subpopulação analisada em cada grupo. Além disso, a soma dos percentuais de linfócitos CD4⁺, linfócitos CD8⁺ e células DN de cada experimento é de aproximadamente 100%, indicando que as marcações foram feitas apropriadamente.

As subpopulações linfocitárias foram, então, caracterizadas quanto à expressão de CD69, L-selectina, CD45RB e CD44. CD69 é uma proteína expressa na membrana de linfócitos T e B ativados, macrófagos ativados, célula NK, portanto, apresenta como função a ativação celular e transdução de sinal (Janeway *et al.*, 2000). CD69 parece ser uma das primeiras glicoproteínas de superfície celular induzida precocemente durante a ativação linfóide (Cambiaggi *et al.*, 1992). Para a análise da expressão de CD69, as subpopulações de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e células DN de cada grupo foram inicialmente identificadas como apresentado nos citogramas para cada grupo (gráfico 6A). A seguir, as subpopulações de cada grupo foram examinadas quanto à expressão de CD69 como apresentado no histograma (gráfico 6B). Para melhor análise dos dados, os valores da percentagem de subpopulações de linfócitos dos linfonodos que expressam CD69 em cada grupo estão apresentados na tabela 2.

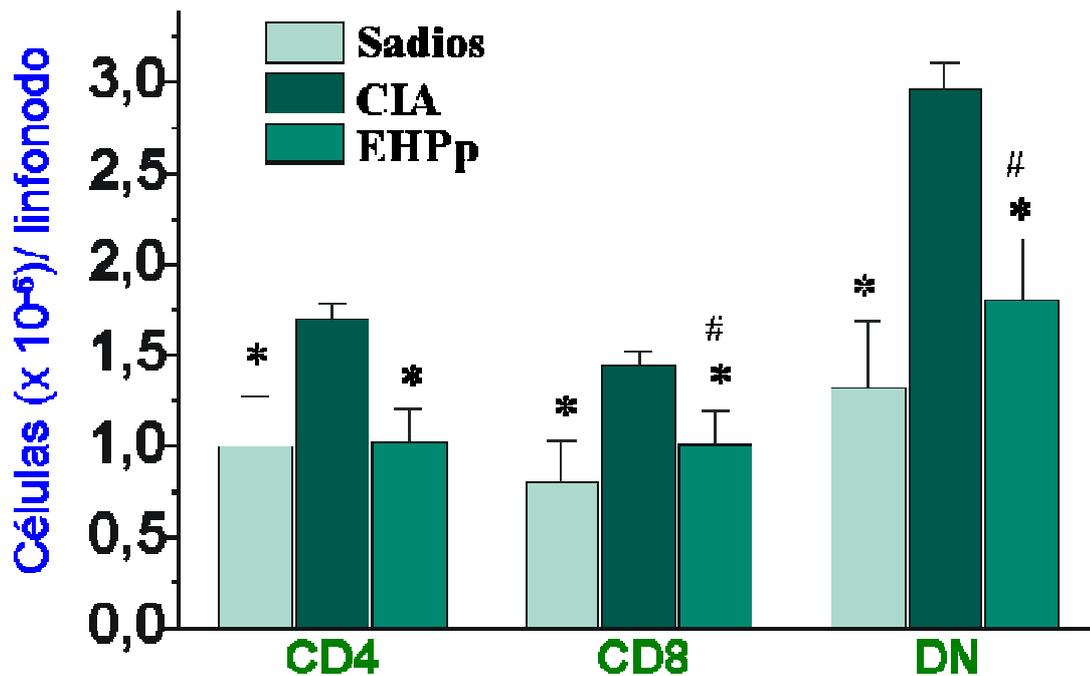


Gráfico 4. Número absoluto de subpopulações linfocitárias em linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA – animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. O número total de linfócitos de cada subpopulação foi obtido pela multiplicação do número médio de células do linfonodo pela percentagem de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ ou DN. Resultados demonstram média \pm D.P. de 2 experimentos independentes com “pool” de linfócitos de LNs inguinais. * P < 0,001 em relação ao grupo CIA; # P < 0,001 em relação ao grupo sadio (ANOVA e Tukey).

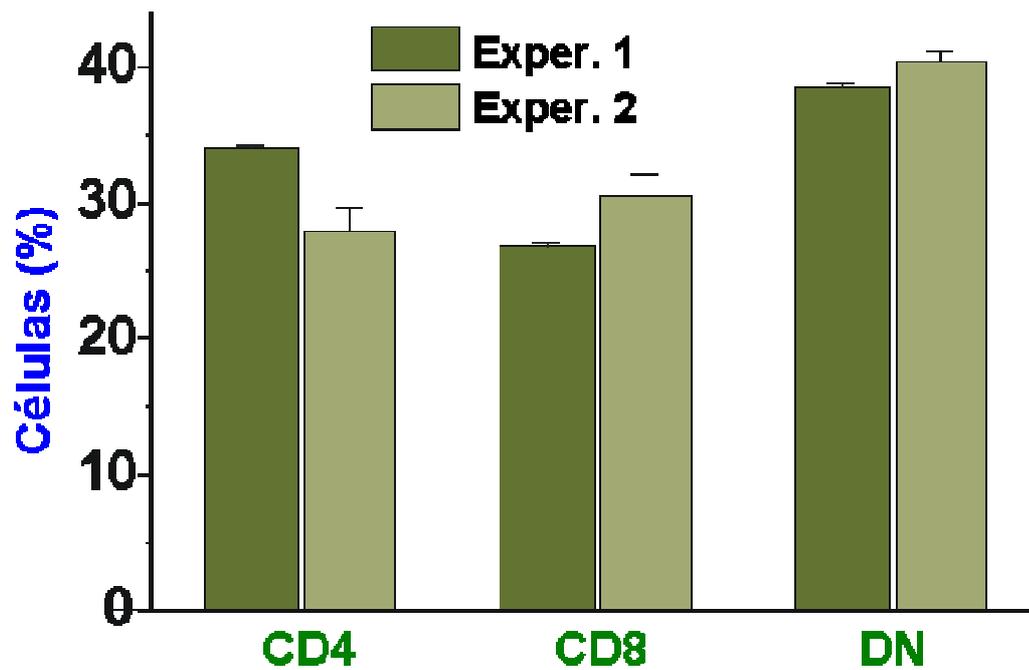


Gráfico 5. Controle intra-experimental das marcações triplas de células de linfonodos de animais saudáveis. Analisou-se dois experimentos independentes: experimento 1 com 3 marcações triplas, e o experimento 2 com 4 marcações triplas, ambas com “pool” de células de linfonodos inguinais de animais saudáveis. Resultados representam: média \pm D.P. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os experimentos (ANOVA).

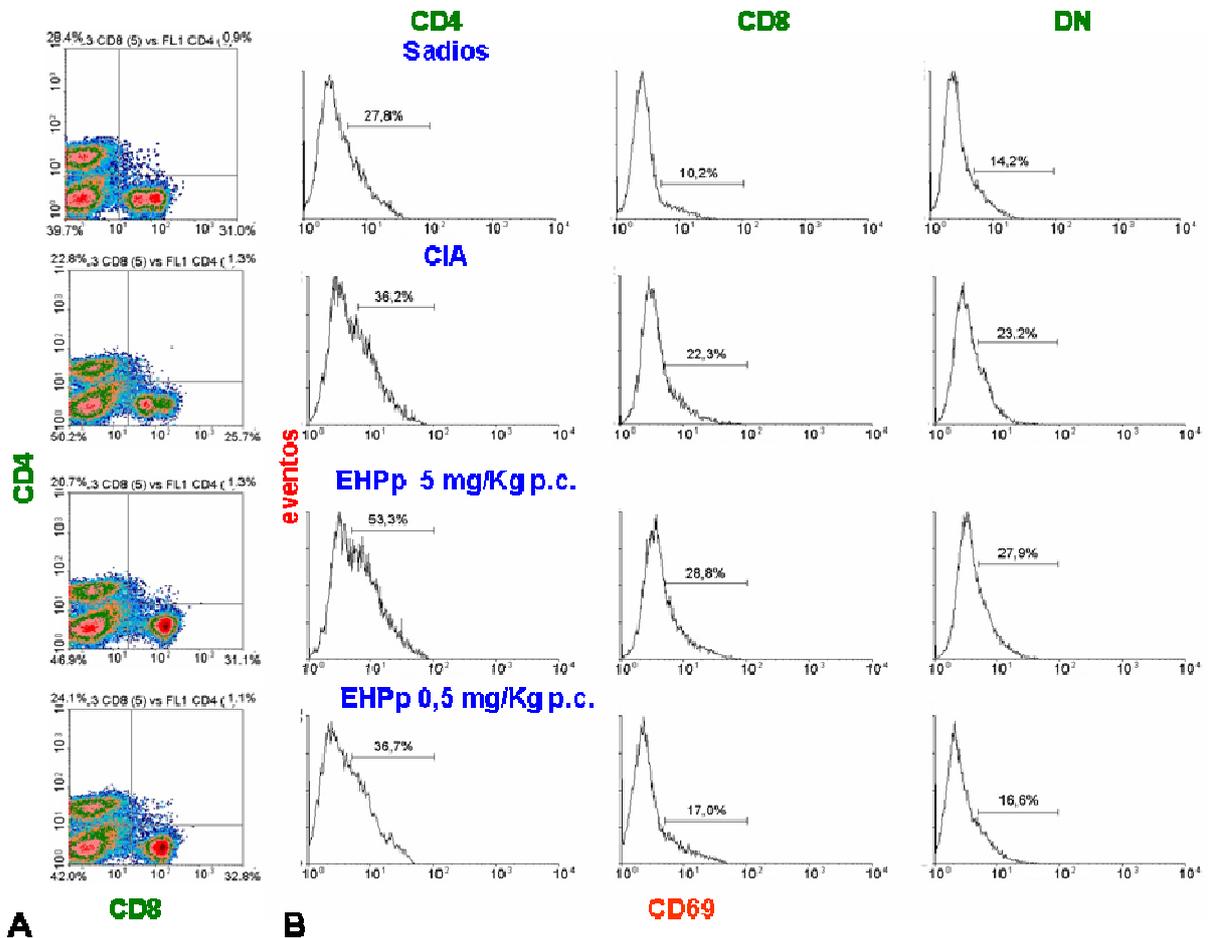


Gráfico 6. Análise citofluorimétrica da expressão de CD69 nas subpopulações de linfócitos nos linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA – animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 5 ou 0,5 mg/kg. A. Citogramas apresentam as subpopulações em função da expressão de CD4 e CD8. B. Percentagens de células CD69⁺ nas diferentes subpopulações são mostradas nos histogramas. Experimento representativo.

A partir dos resultados de percentagens de linfócitos que expressam CD69 (tabela 2), pode-se avaliar que o grupo com CIA tratado com EHPp 5 mg/kg possui os maiores percentuais em todas as subpopulações de células, enquanto que os sadios, os menores. No entanto, conforme análise da gráfico 7, os valores absolutos de linfócitos CD4⁺CD69⁺, CD8⁺CD69⁺ e DN CD69⁺ revelam que estas subpopulações de linfócitos ativados estão aumentadas de forma significativa nos linfonodos inguinais dos animais com artrite quando comparados aos grupos sadios e EHPp 0,5 mg/kg. O grupo de animais tratados com EHPp apresenta diferença significativa em relação aos sadios, nas três subpopulações.

Tabela 2. Percentagem de células que expressam CD69 nas subpopulações de linfócitos de linfonodos.

	Subpopulações celulares CD69 ⁺ (%)		
	CD4	CD8	DN
Sadios	27,8%	10,2%	14,2%
CIA	36,2%	22,3%	23,2%
EHPp 5 mg/kg	53,3%	28,8%	27,9%
EHPp 0,5 mg/kg	36,7%	17,0%	16,6%

Outro marcador de superfície, CD44 foi pesquisado nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e DN dos linfonodos inguinais. CD44 é uma molécula de adesão expressa em linfócitos, macrófagos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais. CD44 é descrito como um marcador de ativação celular em decorrência do aumento de sua expressão após estimulação dos linfócitos T. Envolvido na ligação e rolamento dos leucócitos no endotélio, encaminhamento para órgãos linfóides periféricos e sítios de inflamação (Janeway *et al.*, 2000).

Primeiramente foram identificadas as subpopulações de cada grupo no citograma (gráfico 8A.). Os histogramas mostram a percentagem de linfócitos que expressam CD44 em cada subpopulação em cada grupo. Estes valores estão apresentados na tabela 3.

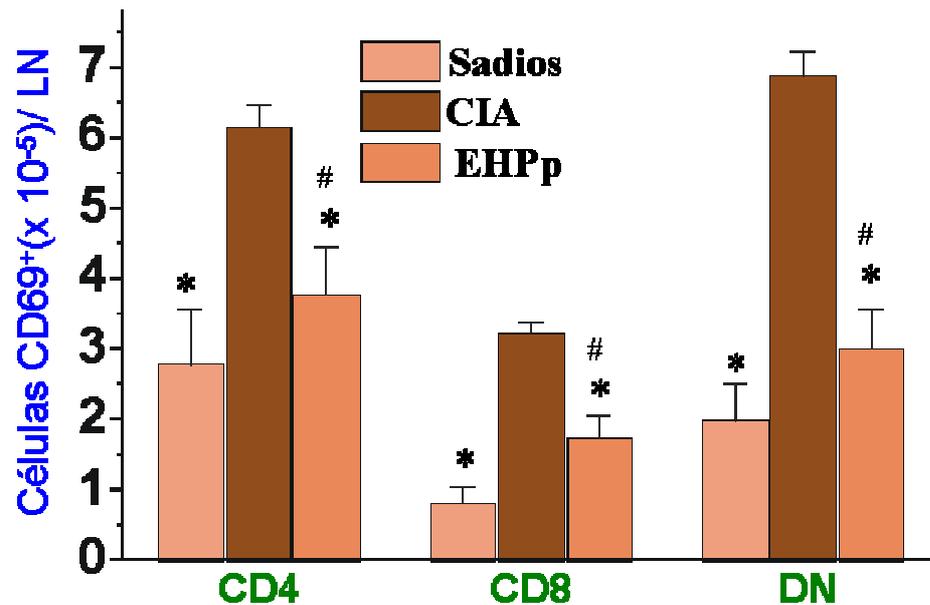


Gráfico 7. Número absoluto de células CD69⁺ entre as subpopulações linfocitárias de linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA –animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. Resultados representam: média \pm D.P. de 2 experimentos independentes com “pools” de linfócitos de linfonodos inguinais. * P < 0,001 em relação ao grupo CIA; # P < 0,001 em relação ao grupo sadios (ANOVA e Tukey).

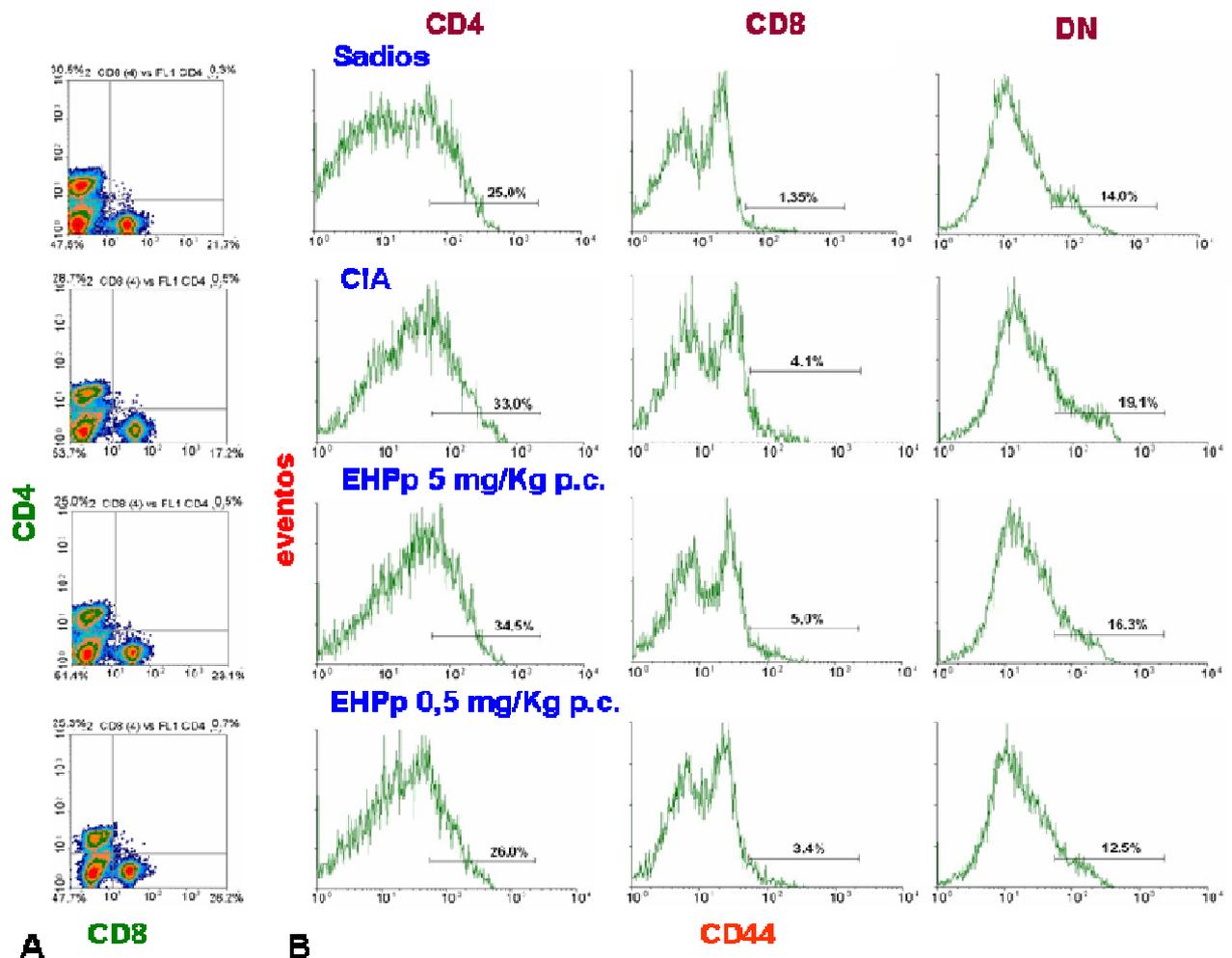


Gráfico 8. Análise citofluorimétrica da expressão de CD44 nas subpopulações de linfócitos em linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA – animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 5 ou 0,5 mg/kg. A. Citogramas apresentam as subpopulações em função da expressão de CD4 e CD8. B. Percentagens de células CD44^{hi} nas diferentes subpopulações são mostradas nos histogramas. Experimento representativo.

A análise dos resultados (gráfico 8 e tabela 3) permite inferir que a percentagem de linfócitos CD44^{hi} (alta expressão de CD44) foi maior no grupo CIA tratado com EHPp 5 mg/kg em todas as subpopulações de linfócitos dos linfonodos inguinais, enquanto que o grupo dos animais sadios apresentou a menor percentagem de linfócitos CD4⁺CD44^{hi} e CD8⁺CD44^{hi}. Estando a menor percentagem de células DNCD44^{hi} presente no grupo com CIA tratado com EHPp 0,5 mg/kg.

Tabela 3. Percentagem de células que expressam CD44 nas subpopulações de linfócitos de linfonodos.

	Subpopulações celulares CD44 ^{hi} (%)		
	CD4	CD8	DN
Sadios	25,0%	1,35%	14,0%
CIA	33,0%	4,1%	12,2%
EHPp. 5 mg/kg	34,5%	5,0%	16,3%
EHPp 0,5 mg/kg	26,0%	3,4%	12,5%

Os valores absolutos de linfócitos CD4⁺CD44^{hi}, CD8⁺CD44^{hi} e DNCD44^{hi} revelam que estas subpopulações de linfócitos estão aumentadas de forma significativa nos linfonodos inguinais dos animais com artrite quando comparados aos grupos sadios e EHPp 0,5 mg/kg (gráfico 9). Os grupos sadios e CIA tratado com EHPp 0,5 mg/kg não apresentaram diferença significativa nas subpopulações de linfócitos CD4⁺ e DN. Entretanto, o número total de linfócitos CD8⁺CD44^{hi} por linfonodo inguinal foi estatisticamente diferente entre os três grupos.

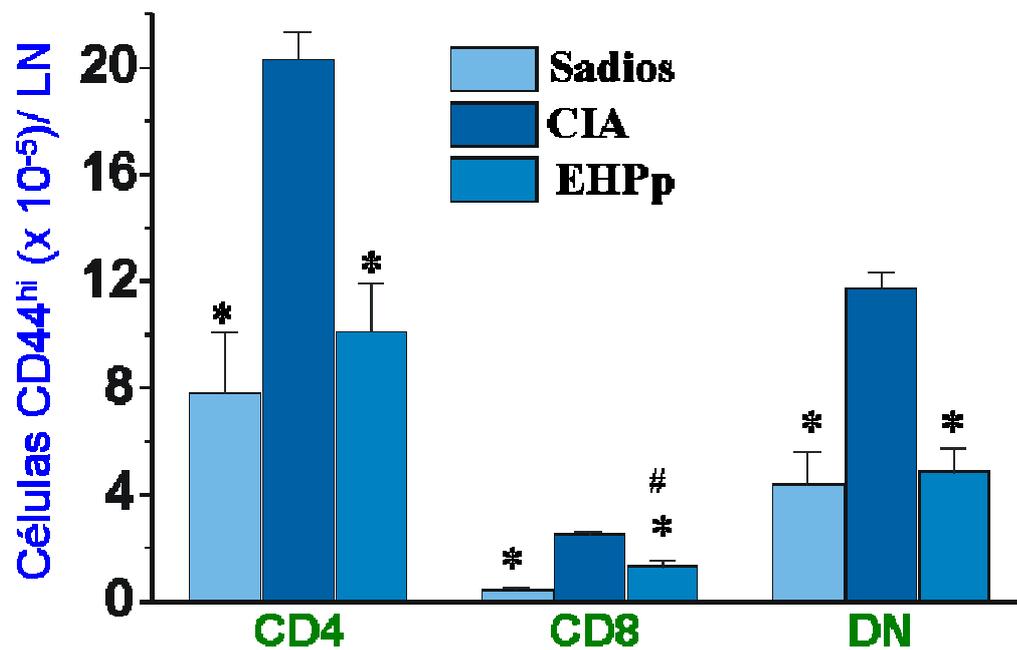


Gráfico 9. Número absoluto de células CD44^{hi} entre as subpopulações linfocitárias de linfonodo. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA –animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. Resultados representam: média \pm D.P. de 2 experimentos independentes com “pools” de linfócitos de linfonodos inguinais. * P< 0,001 em relação ao grupo CIA; # P< 0,001 em relação ao grupo sadios (ANOVA e Tukey).

Identificou-se também a população de linfócitos T CD3⁺ que expressam L-selectina (CD62L), uma molécula de adesão presente em leucócitos que se liga ao endotélio relacionado ao “homing” de linfócitos T “naives” para linfonodos periféricos. As células que expressam CD62L são em grande parte linfócitos B do sangue periférico, linfócitos T, monócitos, granulócitos, células NK, linfócitos de medula óssea e células mielóides (Janeway *et al.*, 2000). O gráfico 10 apresenta os histogramas de expressão de L-selectina em linfócitos T CD3⁺ e células CD3⁻ de linfonodos de camundongos saudáveis, com CIA tratado com etanol 15% e EHPp 0,5 mg/kg.

A análise dos dados apresentados no gráfico 10 permite inferir que não há diferença estatística entre as populações de linfócitos CD3⁺ L sel^{-/in}, células com marcação negativa ou intermediária para L-selectina (CD62L), bem como entre as populações de células CD3⁺ L sel^{-/in} nos diferentes grupos. Ainda, metade da população de células L sel^{-/in} são CD3⁺ outra CD3⁻.

O número absoluto de células L-sel^{-/in} entre as subpopulações células CD3⁺ e CD3⁻ de linfonodos inguinais estão apresentados no gráfico 11.

Ao analisarmos o número absoluto de células L-sel^{-/in} entre células CD3⁺ e CD3⁻ nos linfonodos, identificamos que o grupo CIA apresentou um maior número de linfócitos T CD3⁺L-sel^{-/in} e células CD3⁻ L-sel^{-/in} em relação aos grupos sadio e EHPp. Por sua vez, o grupo EHPp apresentou as duas populações de células L-sel^{-/in} em menor número em relação ao grupo sadio.

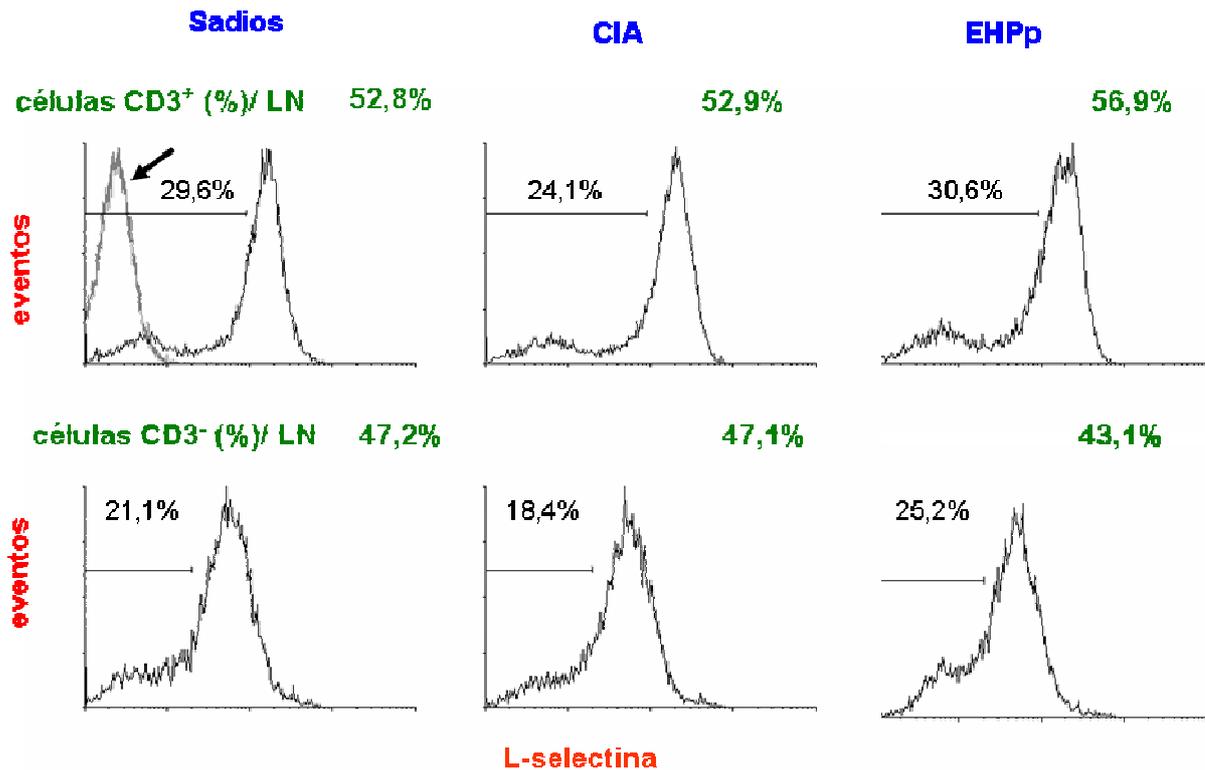


Gráfico 10. Número relativo de células L-selⁱⁿ entre células CD3⁺ e CD3⁻ de linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA –animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. Histogramas na parte superior da figura: células CD3⁺(%)/ LN que expressam L-selectina. Histogramas na parte inferior da figura: células CD3⁻(%)/ LN que expressam L-selectina. Resultados de 1 experimento com “pool” de células de LNs inguinais. O controle da marcação está indicado pela seta.

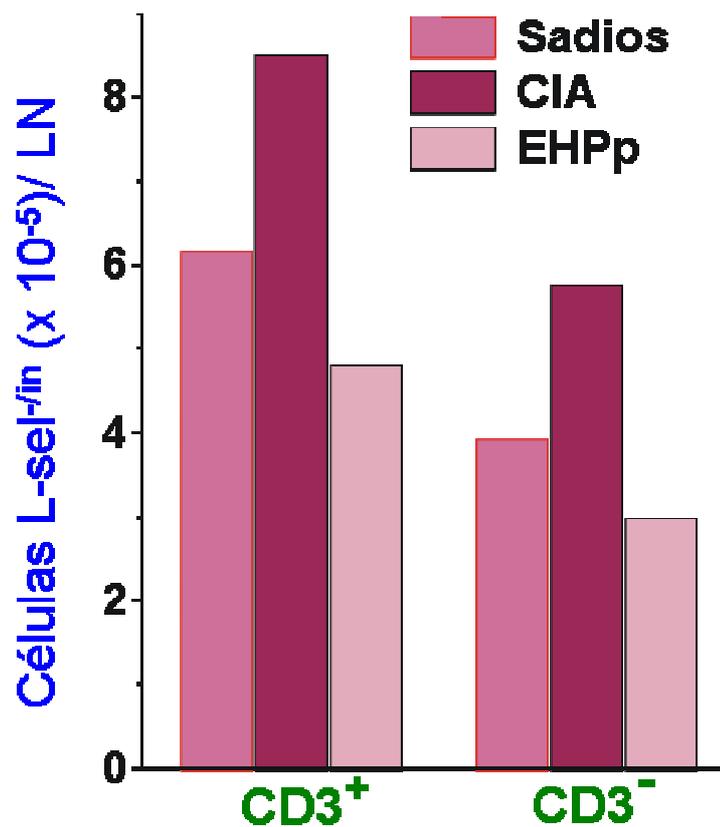


Gráfico 11. Número absoluto de células L-sel^{/in} entre células CD3⁺ e CD3⁻ de linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA –animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. Resultados de 1 experimento com “pool” de células de linfonodos inguinais.

A expressão de L-selectina (CD62L) também foi analisada nas subpopulações linfocitárias TCD4⁺ e TCD8⁺ (ambos apresentam CD3). O gráfico 12 apresenta a distribuição de células em função da expressão de CD4 e CD8 nos citogramas (gráfico 12A) e a expressão de L-sel nestas subpopulações em LN em histogramas (gráfico 12B). As percentagens de expressão de L-sel^{-/in} nas subpopulações de linfócitos de linfonodos de camundongos dos grupos estão apresentadas na tabela 4 para uma melhor análise.

Conforme identificado na análise da população células L-sel^{-/in} entre células CD3⁺ e CD3⁻ de linfonodos, cerca de 50% dos linfócitos CD3⁺ (gráfico 10), que são os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, são L-sel^{-/in} (gráfico 12).

Os resultados da tabela 4 (percentuais) indicam que o tratamento com EHPp 0,5 mg/kg apresenta o maior valor para linfócito CD4⁺Lsel^{-/in}, enquanto que para CD8, os grupos apresentaram uma percentagem uniforme. Quanto às células DN, os sadios apresentaram a maior percentagem (gráfico 12 e tabela 4). Entretanto, para uma análise mais apurada, os valores absolutos foram calculados.

O número total de células Lsel^{-/in} por linfonodo inguinal (gráfico 13) foi significativamente diferente entre os grupos sadio, CIA e EHPp para todas as subpopulações. O número absoluto de linfócitos CD4⁺Lsel^{-/in} não apresentou diferença estatística entre os grupos sadios e EHPp, mas o número absoluto de linfócitos CD8⁺Lsel^{-/in} e de células DN Lsel^{-/in} teve diferença significativa.

Tabela 4. Percentagem de células que expressam L-sel^{-/in} nas subpopulações de linfócitos de linfonodos.

	Subpopulações celulares L-sel ^{-/in} (%)		
	CD4	CD8	DN
Sadios	42,6%	13,0%	54,8%
CIA	36,3%	14,2%	45,1%
EHPp 0,5 mg/kg	47,7%	12,4%	52,1%

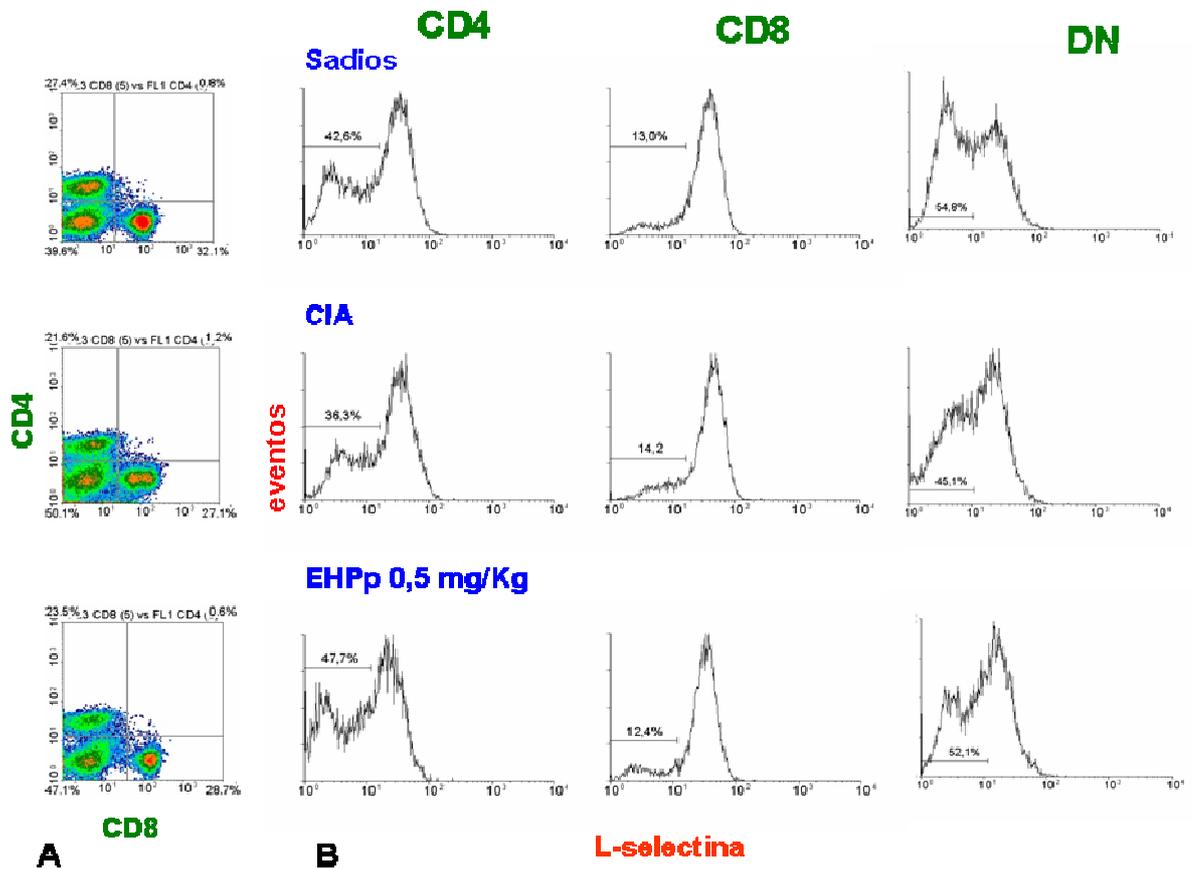


Gráfico 12. Análise citofluorimétrica da expressão de L-selectina nas subpopulações de linfócitos CD4 e CD8 em linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA – animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. A. Citogramas apresentam as subpopulações em função da expressão de CD4 e CD8. B. Percentagens de células L-selectina nas diferentes subpopulações são mostradas nos histogramas. Experimento representativo.

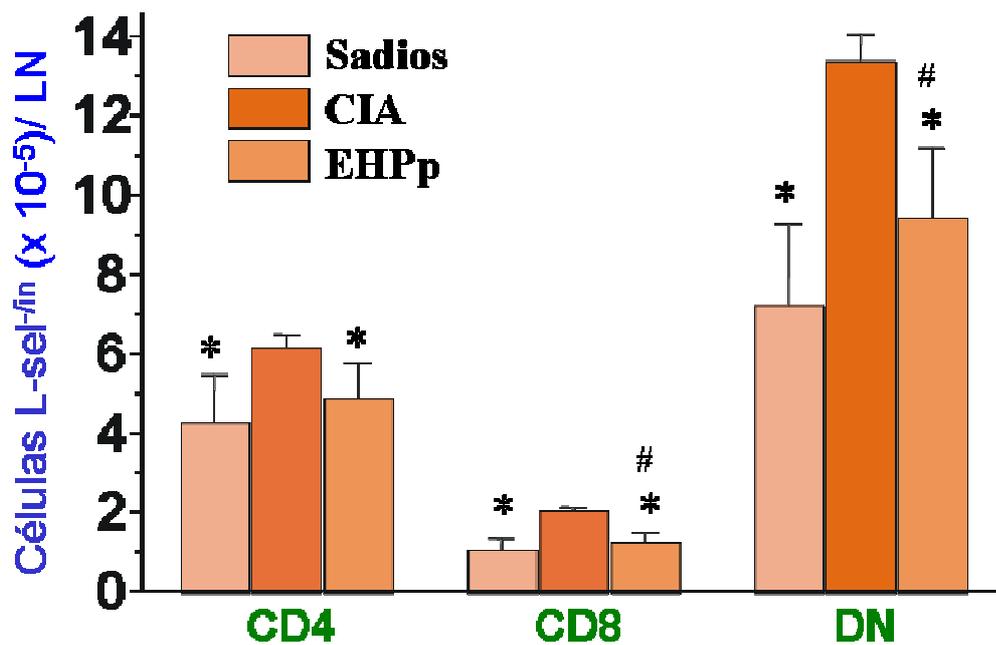


Gráfico 13. Número absoluto de células $Lsel^{-fin}$ entre as subpopulações linfocitárias de linfonodo. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA – animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. Resultados representam: média \pm D.P. de 2 experimentos independentes com “pools” de linfócitos de linfonodos inguinais. * $P < 0,001$ em relação ao grupo CIA; # $P < 0,001$ em relação ao grupo sadios (ANOVA e Tukey).

Outro marcador analisado neste trabalho foi CD45RB, presente em todas as células hematopoiéticas, possui papel essencial da ativação mediada pelo receptor do antígeno de célula B e T (Janeway *et al.*, 2000). O gráfico 14 apresenta a análise citofluorimétrica da expressão de CD45RB em subpopulações de linfócitos de linfonodos. A tabela 5 informa as percentagens de células CD45RB^{hi} conforme subpopulações linfocitárias de cada grupo estudado.

A partir dos resultados da tabela 5, pode-se avaliar que o grupo com CIA apresentou a maior percentagem de células CD4⁺CD45RB^{hi}, bem como em valores absolutos (gráfico 15), para linfócitos CD8⁺ e DN. Não havendo diferença significativa entre os grupos sadios e EHPp.

Tabela 5. Percentagem de células que expressam CD45RB^{hi} nas subpopulações de linfócitos de linfonodos.

	Subpopulações celulares CD45RB ^{hi} (%)		
	CD4	CD8	DN
Sadios	36,5%	89,9%	74,5%
CIA	41,5%	92,7%	71%
EHPp 5 mg/kg	36,0%	89,1%	75,6%
EHPp 0,5 mg/kg	34,5%	87,9%	71%

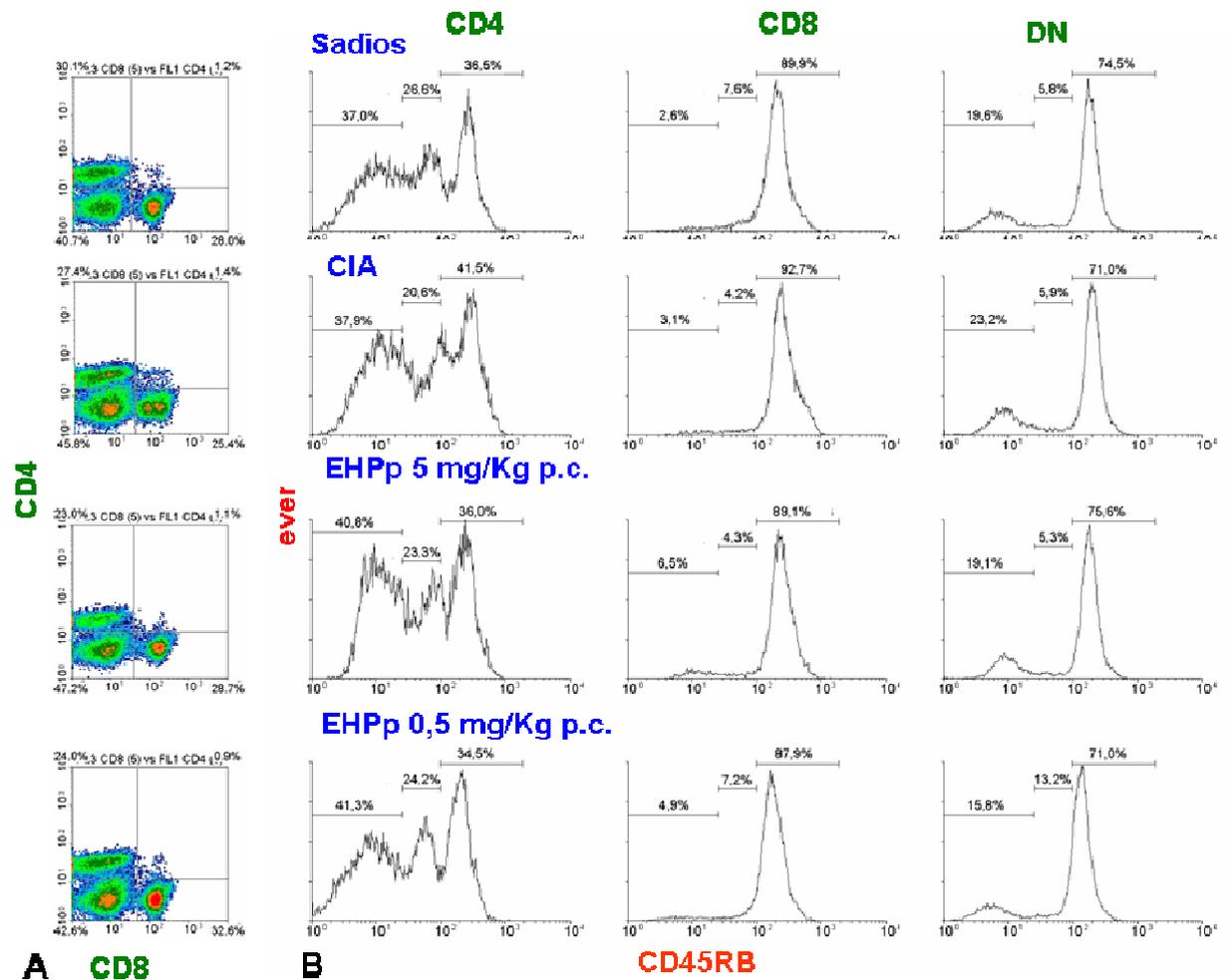


Gráfico 14. Análise citofluorimétrica da expressão de CD45RB em subpopulações de linfócitos de linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA – animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 5 e 0,5 mg/kg. A. Citogramas apresentam as subpopulações em função da expressão de CD4 e CD8. B. Percentagens de células CD45RB nas diferentes subpopulações são mostradas nos histogramas. Experimento representativo.

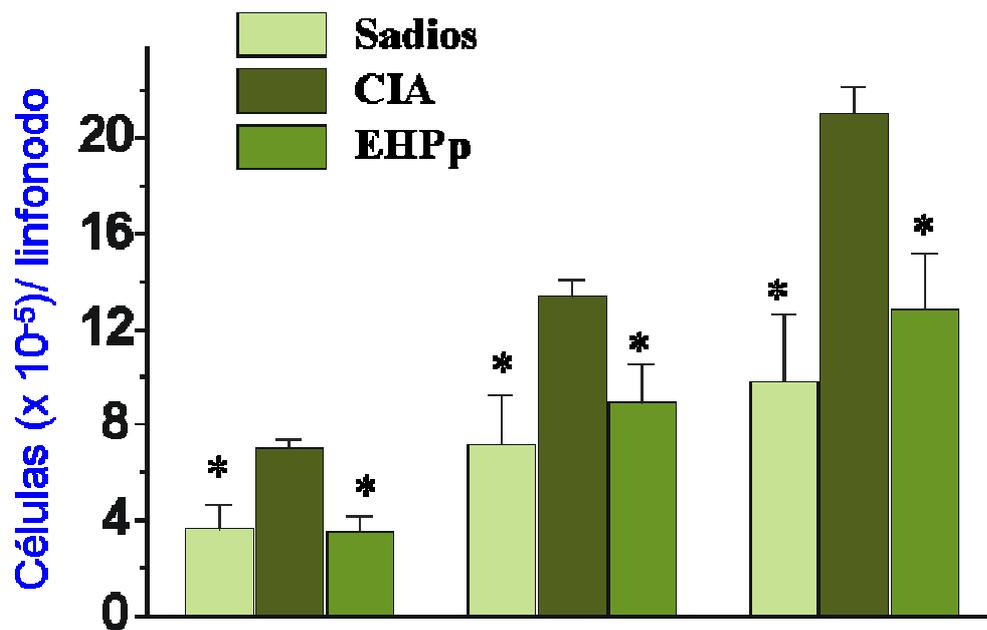


Gráfico 15. Número absoluto de células CD45RB^{hi} entre as subpopulações linfocitárias de linfonodos. Sadio – animais tratados com veículo (etanol 15%); CIA – animais que sofreram indução de artrite induzida por colágeno (CIA) e foram tratados com etanol 15%; EHPp - animais que sofreram a indução de CIA e foram tratados com EHPp na dose de 0,5 mg/kg. Resultados representam: média ± D.P. de 2 experimentos independentes com “pools” de linfócitos de linfonodos inguinais. * P < 0,001 em relação ao grupo CIA (ANOVA e Tukey).

3.2 Efeito do Extrato Hidroalcoólico de Sementes de *Pterodon polygalaeflorus* na Mielopoiese em Baço (Expansão da População de Células Mac-1⁺) de Camundongos Primados com Adjuvante de Freund Completo.

Granulócitos, monócitos, células NK, subgrupo de linfócitos T, populações de linfócitos B expressam CD11b (células Mac-1⁺). Entre outras funções, estas células mediam as interações dos neutrófilos e dos monócitos com o endotélio estimulado e a expansão ou quimiotaxia dos leucócitos (Janeway *et al.*, 2000). Com o intuito de verificar a possível atividade moduladora do EHPp na geração da população de células Mac-1⁺ no baço de camundongos DBA1/J primados com AFC, os camundongos foram tratados durante 9 dias com etanol 15% (veículo) ou EHPp (5 mg/kg) ou receberam água por via oral. No quinto dia de tratamento, injetou-se AFC i.d. com o intuito de aumentar o número de células Mac-1⁺ nos baços dos camundongos conforme relatado por Matthys e colaboradores (1999). Como controle do experimento, identificou-se a percentagem normal da população de células Mac-1⁺ no baço de camundongos tratados com etanol 15% ou água (sadios) por gavagem durante 9 dias. Estes dois grupos não receberam injeção de AFC no 5º dia de experimento, permitindo, desta forma, a identificação de possível aumento da percentagem desta população celular somente pelo tratamento com EHPp, sem a influência da injeção de AFC. No 10º dia de experimento, os baços foram retirados e marcados com anticorpos anti-CD11b fluorocromados para posterior análise em Citometria de Fluxo.

Conforme resultados expressos no gráfico 16, os percentuais de células Mac-1⁺ nos baços de camundongos primados com AFC tratados com veículo ou que receberam água aumentaram mais do que o dobro em relação aos animais sadios tratados com água ou etanol 15% cujo nível basal se aproxima ao relatado por Matthys e colaboradores (1999). A administração de EHPp aos camundongos sadios não alterou o percentual basal de células Mac-1⁺ em relação aos animais sadios tratados com etanol 15% (gráfico 17).

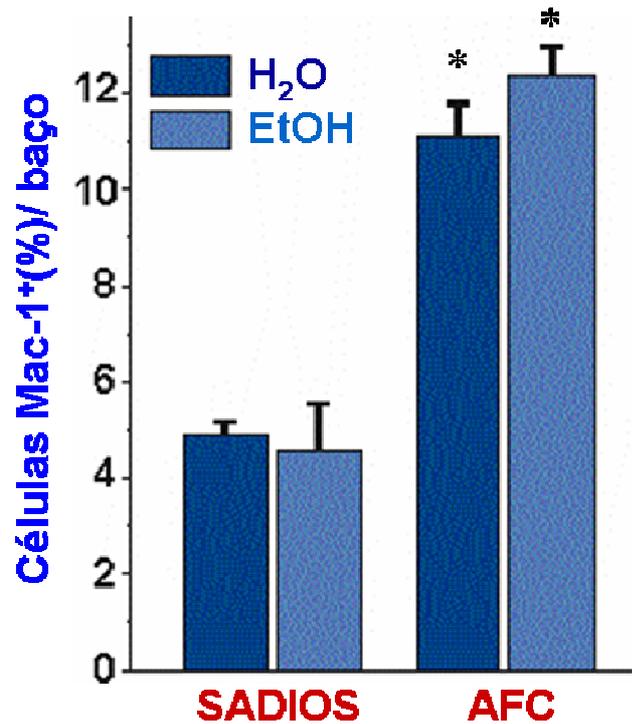


Gráfico 16. Número relativo de células Mac-1⁺ em baços de DBA/1J primados ou não com AFC e tratados com água ou etanol 15%. Tratamento por gavagem, diário, de água (H₂O) ou etanol 15% (EtOH) do dia 1 ao 9. Grupo AFC- a mielopoiese foi estimulada com AFC injetado i.d. no dia 5. Grupo Sadios- não foi administrado AFC. No 10^o dia os animais foram sacrificados para análise. Resultados representam: média ± D.P. de 2 experimentos independentes com "pools" de células de baço de 3 a 4 animais. * P<0,001 em relação ao animais sadios (ANOVA e Tukey).

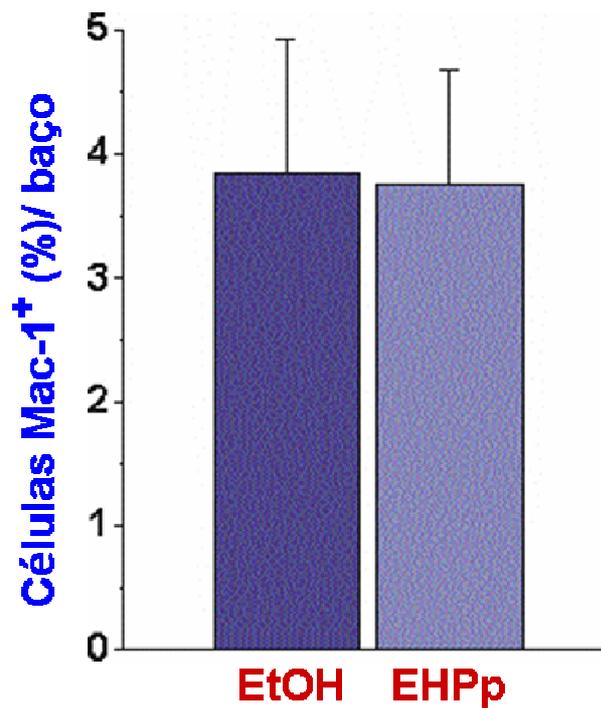


Gráfico 17. Número relativo de células Mac-1⁺ em baços de DBA1/J não primados com AFC tratados com etanol ou EHPp (5 mg/kg). Tratamento por gavagem, diário, de etanol 15% (EtOH) ou EHPp (5 mg/kg), do dia 1 ao 9. No 10^o dia os animais foram sacrificados para análise. Resultados representam: média \pm D.P. de 2 experimentos independentes com “pools” de células de baço de 3 a 4 animais. $P > 0,05$ entre EtOH e EHPp (ANOVA).

A partir dos resultados dos controles, realizou-se o experimento para verificação da possível modulação por EHPp da população de células Mac-1⁺ em baços induzido por AFC. A figura a seguir apresenta os citogramas (gráfico 18A), apresentando a distribuição das células em função da granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) dos baços dos animais tratados com etanol (EtOH) sem injeção de AFC, animais primados com AFC tratados previamente com etanol 15% (AFC) e animais primados com AFC tratados previamente com EHPp. O gráfico 18B apresenta os histogramas com distribuição das células em função da expressão de Mac-1.

O gráfico 19 demonstra o percentual de células Mac-1⁺ no baço de camundongos controle (sadios), camundongos primados com AFC tratados previamente com etanol 15% (AFC), com EHPp e com extrato aquoso de Chapéu de Couro (1,4 mg/kg, como outro controle do experimento).

Quanto ao número absoluto de células por baço, este não difere entre os animais tratados com etanol 15% não primados (EtOH) e primados com AFC (AFC) e entre camundongos primados com AFC tratados com etanol 15% e EHPp 0,5 mg/kg (+ EHPp) (gráfico 20).

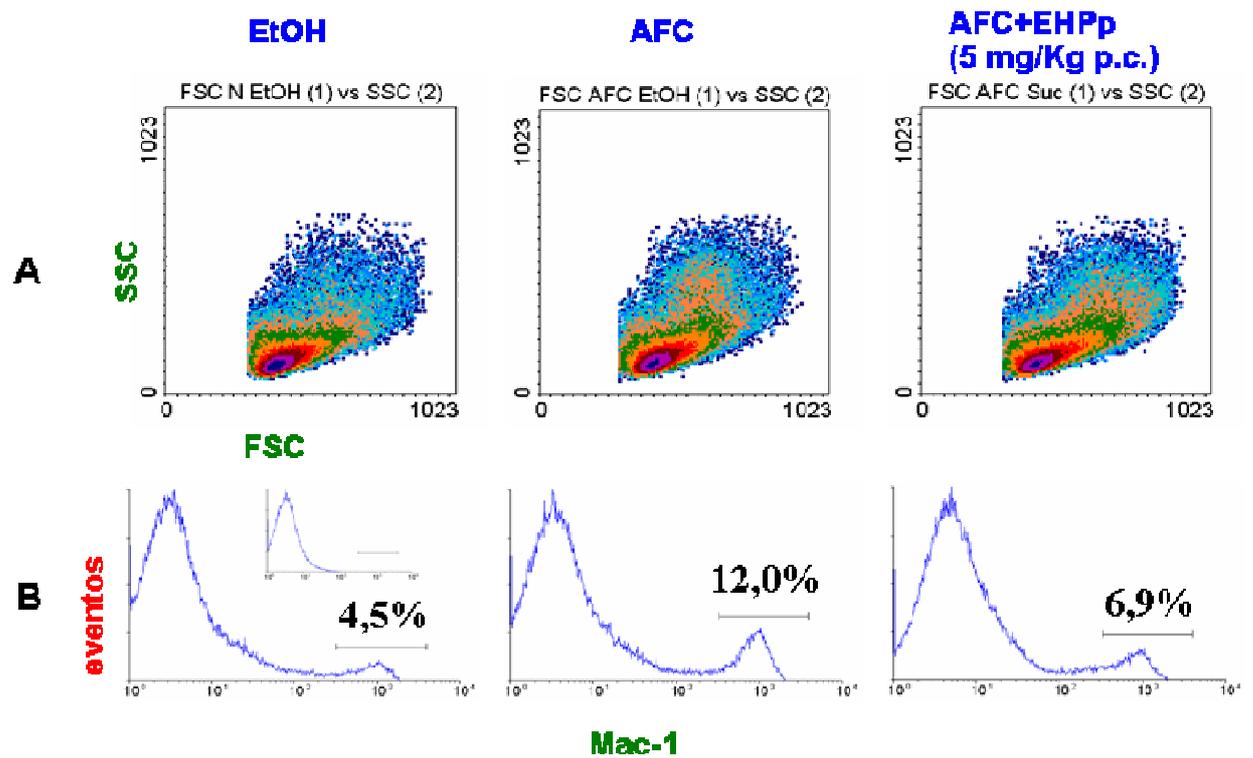


Gráfico 18. Expressão de células Mac-1⁺ em baços de DBA1/J primados com AFC e tratados com etanol ou EHPp. Tratamento e indução da mielopoiese segundo descrito na figura 22. O gráfico inserido no histograma à esquerda (B) representa o controle de marcação.

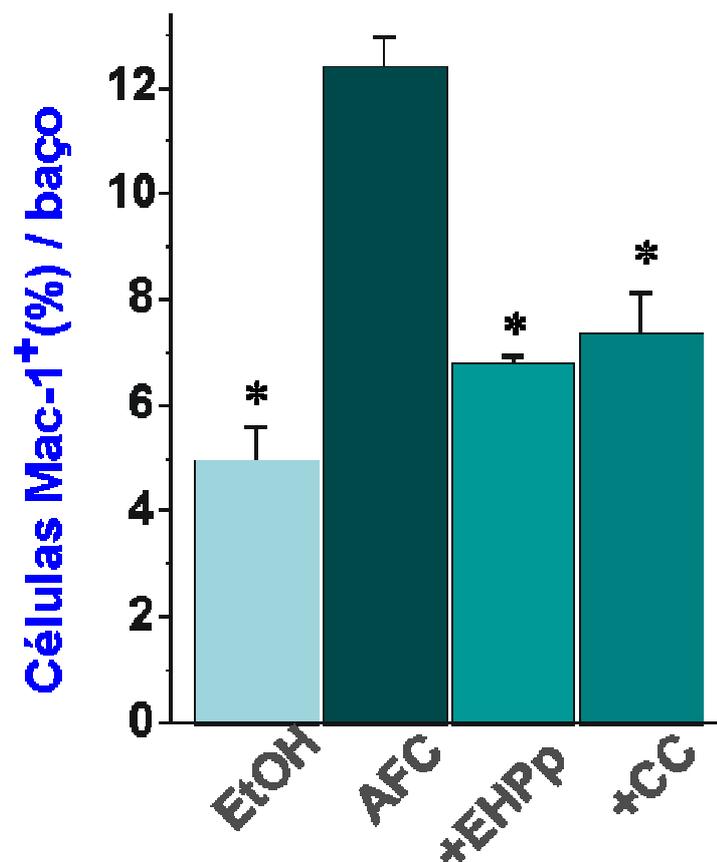


Gráfico 19. Número relativo de células Mac-1⁺ em baços de DBA1/J primados com AFC e tratados com etanol ou EHPp. EtOH – animais tratados com etanol 15%; AFC – animais tratados com etanol 15% primados com AFC; +EHPp – animais tratados com EHPp (0,5 mg/kg) primados com AFC; +CC – animais tratados extrato aquoso de Chapéu de Couro (1,4 mg/kg) como outro controle do experimento. Resultados representam: média \pm D.P. de 2 experimentos independentes com “pools” de células de baço de 3 a 4 animais.* P<0,001 em relação ao grupo AFC.

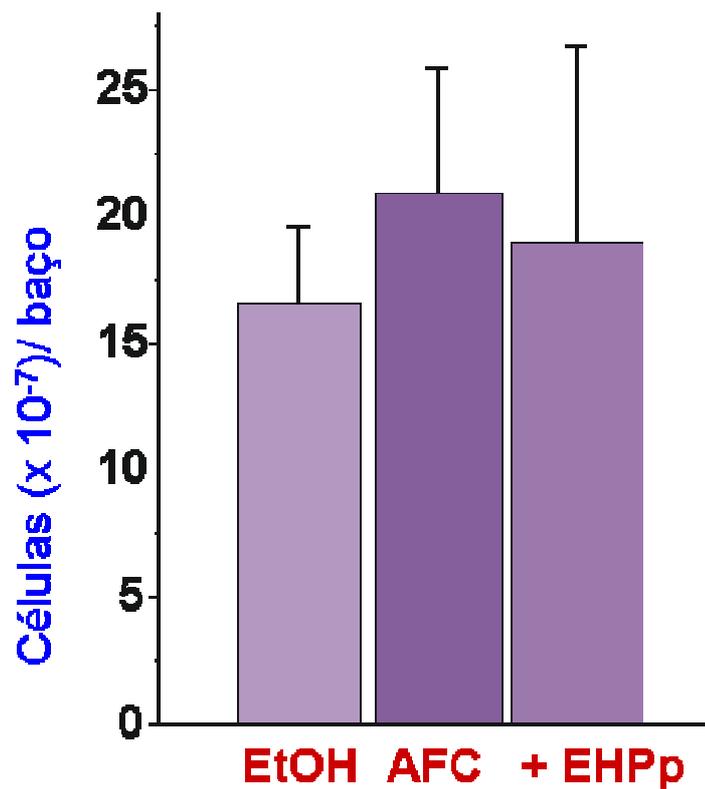


Gráfico 20. Número absoluto de células de baços de DBA1/J primados com AFC e tratados com etanol ou EHPp 0,5 mg/kg. Resultados representam: média \pm D.P. de 3 a 5 experimentos independentes com “pools” de células de baço de 3 a 4 animais (EtOH n=15 baços; AFC n=12 baços; AFC + EHPp n=10 baços). $P > 0,05$ entre os grupos (ANOVA).

A produção de radicais livres pelas células Mac-1 positivas foi analisada através da marcação feita por uma sonda intracelular H2-DCFDA (gráfico 21). Os citogramas mostram a distribuição das células em função da granulosidade e tamanho (gráfico 21). O grupo AFC apresentou uma população de células com tamanho e granulosidade altas em relação ao grupo etanol e tratados com EHPp. Os citogramas apresentam a distribuição das células em função da marcação do anticorpo anti-CD11b (Mac-1) e a sonda H2-DCFDA (gráfico 21). Resultados preliminares apontam que as células Mac-1⁺, com alta produção de radicais livres, estão em maior percentagem nos baços de animais primados com AFC em relação ao baço dos animais saudáveis e tratados com EHPp (gráfico 21). O tratamento com EHPp 5 dias antes da injeção de AFC e mantida até o 9º dia de experimento impediu a geração da população de células Mac-1⁺ nos baços de animais tratados.

O estudo da população de células Mac-1 positivas também foi realizado nos experimentos do modelo CIA. O gráfico 22 apresenta as células dos baços de camundongos com CIA tratados com etanol (CIA), com EHPp (5 e 0,5 mg/kg) e camundongos tratados com etanol (EtOH) em citogramas (granulosidade x tamanho) e histograma, mostrando a expressão de Mac-1. Os camundongos sem indução de artrite tratados com etanol 15% não apresentaram aumento da população de células Mac-1⁺ (gráfico 22). Os animais com CIA tratados com etanol 15% (CIA) apresentaram um aumento de cerca de 3 vezes na expressão de Mac-1 em relação ao grupo sadio. Resultados preliminares apontam que os tratamentos com EHPp (5 e 0,5 mg/kg), apresentam praticamente as mesmas percentagens de células Mac-1⁺ que o grupo CIA, cerca de 16,5%. Os números absolutos de células Mac-1⁺ também não foram diferentes entre o grupo CIA tratado com veículo ou EHPp (dados não mostrados).

Para complementar o estudo das células Mac-1⁺ no baço de DBA1/J com CIA e tratados com etanol ou EHPp, estas foram avaliadas quanto à expressão de GR.1, uma proteína de membrana presente principalmente em neutrófilos. O gráfico 23 mostra que a maioria das células Mac-1⁺ são também GR.1 positivas, tanto nos animais controle ou com CIA tratados com etanol ou EHPp.

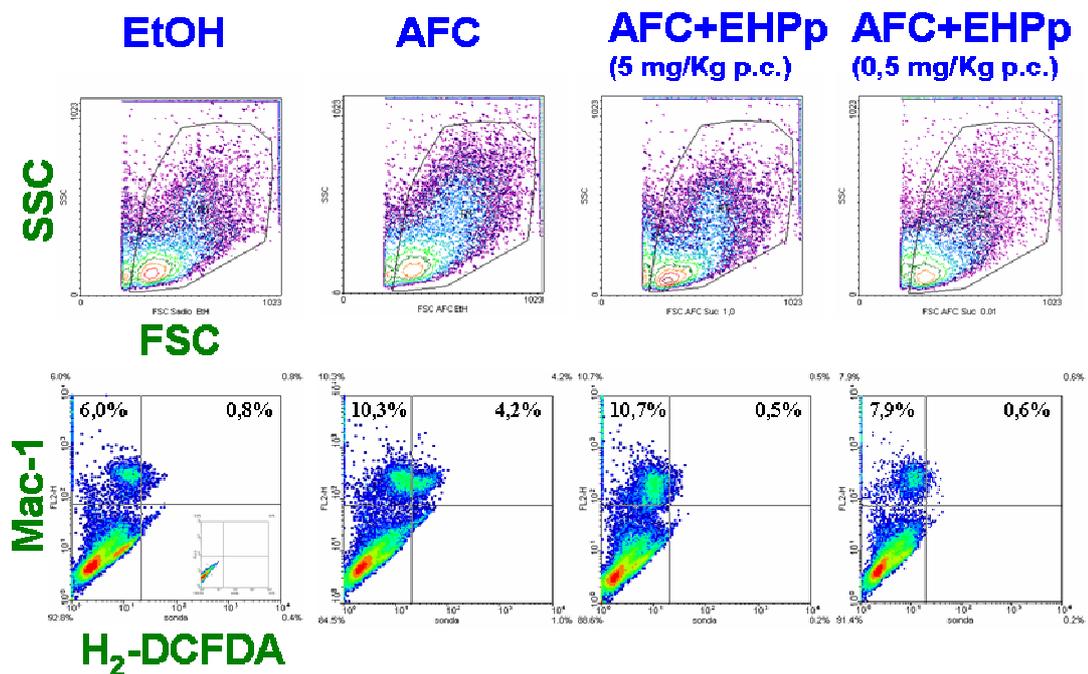


Gráfico 21. Atividade oxidativa em células Mac-1⁺ de baços de DBA1/J primados com AFC e tratados com etanol ou EHPp (0,5 e 5 mg/kg). Análise de 1 experimento com “pool” de células de baço de 4 animais. Tratamento e indução da mielopoiese segundo descrito na figura 22. Sonda H₂-DCFDA detecta espécies reativas de oxigênio.

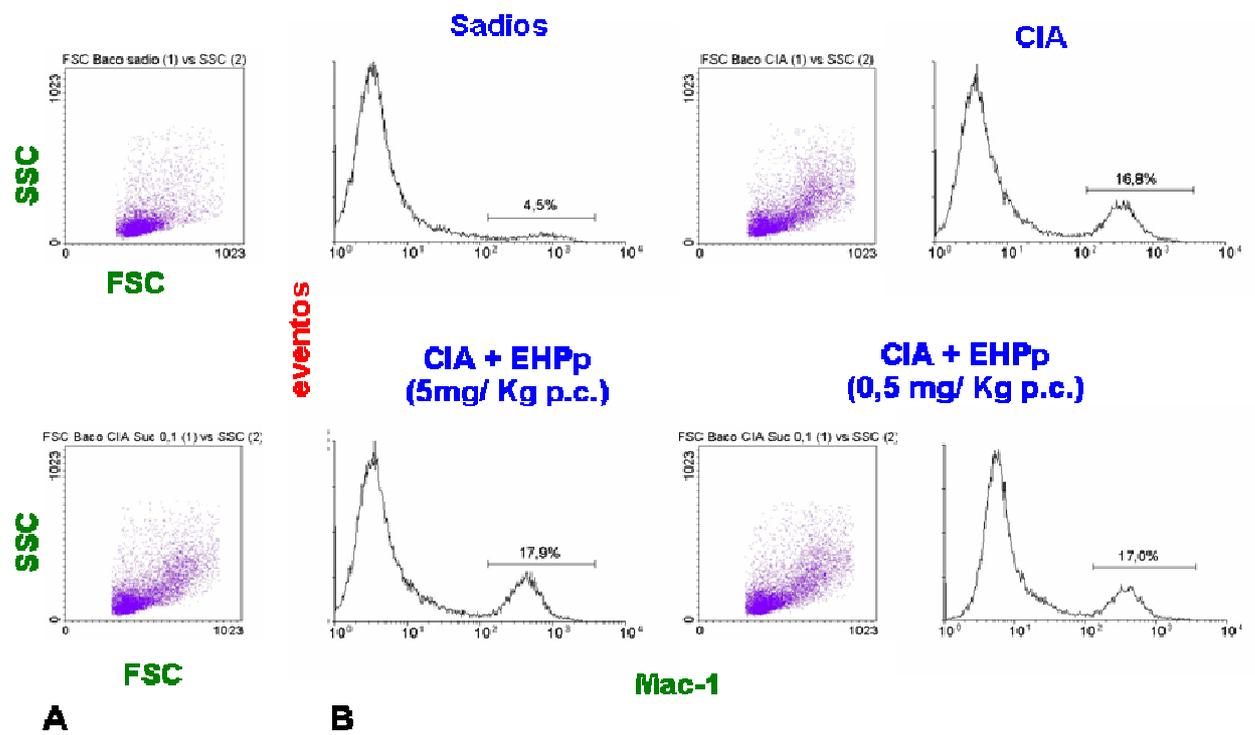


Gráfico 22. Expressão de Mac-1+ em baços de camundongos DBA1/J com CIA e tratados com etanol ou EHPp. Resultados de 1 experimento com “pool” de células de baço de 4 animais. A indução de CIA e o tratamento foram realizados conforme descrito na figura 22.

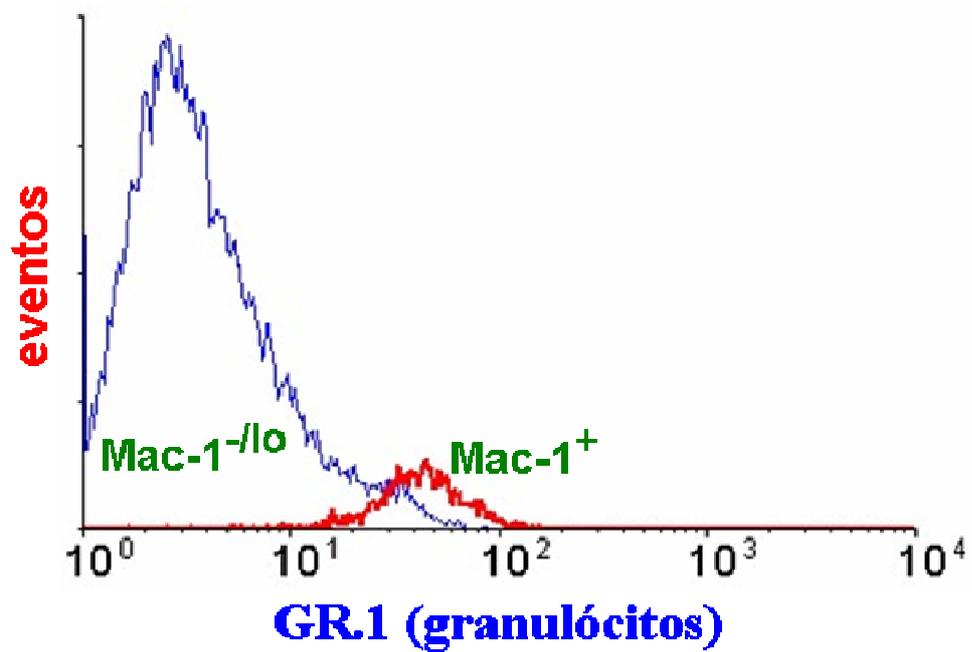


Gráfico 23. Expressão de GR.1 entre células Mac-1⁺ em baços de DBA1/J com CIA e tratados com EHPp. Resultados de 1 experimento com “pool” de células de baço de 4 animais. A indução de CIA e o tratamento foram realizados conforme descrito na figura 22.

4 DISCUSSÃO

Efeito do tratamento com EHPp nas subpopulações linfóides.

O modelo experimental de Artrite Induzida por Colágeno (CIA) é atualmente um dos mais aplicados em estudos por apresentar fisiopatologia similar a Artrite Reumatóide humana. Nosso grupo vem demonstrando que extratos de *Pterodon pubescens* são capazes de reduzir ou mesmo impedir o infiltrado imunoinflamatório nas juntas, impedindo a deformação articular (figura 6), formação do *pannus* sinovial a partir da hiperproliferação de células da membrana sinovial (figura 2) e a formação do edema interarticular (figura 5). A diminuição do número de linfócitos nos linfonodos e, conseqüentemente, do seu tamanho em animais que sofreram indução de CIA e foram tratados com EHPp (figuras 7 e 8) revelam um impacto direto ou indireto do mesmo sobre a expansão dos linfócitos envolvidos no desenvolvimento da CIA. Essa queda no número de células induzida pelo EHPp não é resultado da diminuição de uma subpopulação linfocitária em especial, já que a relação entre linfócitos CD4, CD8 ou DN (cerca de 90% de linfócitos B) em linfonodos inguinais permanece igual em animais sadios tratados com o veículo, com CIA e os propensos à CIA tratados com EHPp (figura 9). O impacto assim ocorre sobre a geração de células das três subpopulações envolvidas no desenvolvimento da CIA como parecem indicar os valores absolutos dos linfonodos inguinais de animais tratados com EHPp, que se aproximam dos valores normais (figura 10).

Efeito do tratamento com EHPp na geração de células ativadas dentre as subpopulações linfóides.

O marcador de superfície CD69 tem expressão aumentada em linfócitos T que recentemente contactaram antígenos (Budd *et al.*, 1987; Lesley *et al.*, 1988). Os resultados da tabela 2 mostram um aumento no número relativo de células CD69⁺

entre as subpopulações CD4, CD8 e DN em animais com CIA, com uma tendência à redução nas últimas duas subpopulações de linfócitos com a menor dose de EHPp (0,5 mg/kg). Isto sugere que o tratamento com EHPp pode estar impedindo, direta ou indiretamente, a ativação de linfócitos ou impedindo o seu acúmulo no linfonodo por estímulo de sua migração. O tratamento com a dose maior de EHPp (5 mg/kg) levou a um aumento das células CD69⁺ nas três subpopulações de linfócitos em relação à CIA, não apresentando também efeito terapêutico ou linfopênico. Estes resultados parecem corroborar os obtidos por nosso grupo com o tratamento da CIA com extrato de sementes de *P. pubescens* onde doses maiores do extrato induziram agravamento da CIA (Sabino *et al.*, 1999a) em parte dos animais do grupo. De destaque é o fato de que o tratamento com a dose maior de EHPp (5 mg/kg) elevou os níveis relativos de células CD69⁺ entre as três subpopulações linfocitárias acima dos níveis observados na CIA e que mesmo a dose menor de 0,5 mg/kg (terapêutica) reverteu, de maneira geral, pouco a elevação destas células em animais com CIA (tabela 2). Isto é indício de que o EHPp ou não impede diretamente a ativação de linfócitos no linfonodo ou faz com que estes se acumulem nesse órgão. Falta da chegada de fatores quimio-atraentes ao órgão ou diminuição da capacidade emigratória das células poderiam explicar este acúmulo. Resultados preliminares mostram que o nível de expressão da cadeia $\alpha 5$ de integrina (i.e. VLA-5), ligante de fibronectina se encontra em níveis iguais nos três grupos e nas três subpopulações (dados não mostrados). Isto reforça a primeira hipótese.

A redução do número absoluto de células CD4, CD8 e DN e dentro destas as CD69⁺ (figura 13) em animais tratados com dose ideal de EHPp 0,5 mg/kg em relação aos não tratados, ratificam o efeito da EHPp impedindo a geração de células envolvidas no desenvolvimento da CIA. Tais resultados também endossam dados da literatura que mostram a necessidade de participação das três subpopulações linfocitárias para o desenvolvimento pleno da CIA (Svensson *et al.*, 1998; Tada *et al.*, 1996). É importante ressaltar que o aumento de expressão de CD69 é transitório e que as subpopulações de células linfóides não são todas ativadas ao mesmo tempo, tornando os valores mostrados bastante significantes. Somando os números absolutos de células CD69⁺ das três subpopulações no grupo CIA na figura 13 ($\sim 1,5 \times 10^6$), verificamos que estas representam cerca de 1/4 das células de um linfonodo inguinal em animais com CIA ($\sim 6,0 \times 10^6$, figura 8). O número de células CD69⁺ é

reduzido à metade em animais com CIA tratados com EHPp ($\sim 0,8 \times 10^6$), valores próximos aos de linfonodos de animais tratados com veículo (figura 13).

Efeito do tratamento com EHPp na geração de células de memória dentre as subpopulações linfóides.

Elevação da expressão de CD44 (receptor de hialuronan) ou CD45RB (fosfatase reguladora do TcR) e diminuição da expressão na superfície de L-selectina (CD62L; ligante de açúcares Sialil Lewis X ou A em mucoproteínas) na membrana têm sido os principais marcadores para caracterizar células T de memória (Sprent, 1997), incluindo linfócitos CD8⁺ (Ku *et al.*, 2000), e linfócitos B IgD de memória (Carril *et al.*, 2002). Dois desses marcadores tem sido mais usados e em conjunto (não sendo o caso do presente estudo): o CD44, cujo aumento parece ocorrer primeiro, e a L-selectina, cuja perda gradual se soma ao aumento do CD44 (Sprent, 1997). Analisando a tabela 3, vemos aumentos relativos de células CD44^{hi} entre os linfócitos CD4 e CD8 de animais com CIA em relação aos sadios, sugerindo o início da geração de células de memória. Em contraste, o número relativo de células L-selectⁱⁿ entre as células CD4 e DN (tabela 4) diminuiu em animais com CIA em relação aos sadios, sugerindo que por perderem este “homing receptor” ganglionar estas estariam prontas a deixar o órgão. Nos dois casos a dose terapêutica de EHPp (0,5 mg/kg) reverteu os níveis de células CD44^{hi} e L-selectⁱⁿ ao padrão dos animais sadios, principalmente as células CD4 (as principais participantes no desenvolvimento da CIA), indicando uma provável ação tanto na geração como no êxodo das células de memória. O aumento da expressão de CD45RB (fosfatase reguladora do TcR) é observado na interação do antígeno com o TcR, ou seja, durante a fase de ativação celular. Então, não surpreende o aumento de células CD45RB^{hi} entre as células CD4 (tabela 5) no grupo CIA, à semelhança do que ocorre com a expressão de CD44 (figura 15), e sua redução com o tratamento com EHPp (figura 21).

Analisados em conjunto, os níveis absolutos ganglionares de células CD44^{hi}, L-selectⁱⁿ e CD45RB^{hi} entre as três subpopulações linfocitárias aumentam drasticamente em gânglios inguinais de animais com CIA. Embora, ao que

conheçamos, não haja dados na literatura sobre a análise de células de memória usando este modelo em camundongos DBA1/J, os resultados aqui apresentados se igualam aos de Campbell e colaboradores (2001) usando camundongos C57BL/6. Mais importante ainda o tratamento com doses diárias ideais de extratos *P. polygalaeflorus* impede drasticamente o desenvolvimento dessas células nos gânglios.

Efeito do tratamento com EHPp na geração de células Mac-1⁺ nos baços de animais injetados com AFC.

Mac-1 (integrina alfaM/beta2), também conhecido como receptor de complemento 3 (CR3), que media a adesão celular com C3b1 e ICAM-1, é expresso em níveis variados em granulócitos, macrófagos, dendríticas, NK e B-1 (apud Taylor *et al.*, 1996). É rápida e positivamente regulado em neutrófilos ativados no mesmo período que a CD62L é liberada da superfície. Tratamento com anticorpos anti-Mac-1 (5C6, não citotóxico), antes do começo esperado da CIA, diminui drasticamente a sua severidade (Taylor *et al.*, 1996). Na CIA, as primeiras células a surgir nas juntas na região sinovial marginal são Mac-1⁺. Também são observadas nesta região células de MHC classe II, células CD4⁺ e células IL-2r⁺ (CD25) mas não linfócitos B ou linfócitos TCD8⁺. Na metade do período de desenvolvimento da CIA, as células Mac1⁺ (polimorfos e macrófagos) tornam a aumentar, havendo poucos linfócitos T (Holmdahl *et al.*, 1988). Parte das células Mac-1⁺ expandidas no baço migram até as juntas onde se diferenciam em osteoclastos maduros responsáveis pela destruição do osso (De Klerck *et al.*, 2004). Mais recentemente foi demonstrado que neutrófilos ativados se ligam firmemente a células dendríticas (DCs) induzindo sua maturação e promovendo uma forte proliferação de células T polarizando-as ao tipo “helper” 1. Essa interação é dependente de Mac-1 nos neutrófilos, e não ocorre com outros leucócitos já que os neutrófilos apresentam carboidratos Lewis(x) específicos presentes na cadeia alfa(M) do Mac-1. Esta interação permite assim um forte elo entre a imunidade inata e a adaptativa (van Gisbergen *et al.*, 2005).

As células inflamatórias Mac-1⁺, como granulócitos, macrófagos e células dendríticas, exercem função importante no desenvolvimento da CIA. A introdução de

um protocolo por nós estabelecido (indução de mielopoiese em baço por AFC) a partir do trabalho de Matthys e colaboradores (1999), que relacionaram o uso de AFC com o aumento da hematopoese (células Mac-1⁺) do baço e desta com a severidade da CIA, teve o objetivo de interpretar o efeito da EHPp sobre estas células utilizando um modelo experimental com tempo de duração mais curto que o modelo da CIA.

À diferença do protocolo de Matthys e colaboradores (1999), injetamos o AFC isoladamente (sem CII), ou seja, sem a geração de uma resposta imune concomitante. Assim mesmo, no tempo analisado (5 dias após a injeção de AFC) os resultados reproduziram os do autor, com aumento de mais do dobro de células Mac-1⁺ nos animais injetados sem AFC em relação aos animais sadios (figura 22). Assim, o aumento de células Mac-1⁺ esplênicas induzido pelo AFC nesse período parece independe da presença do CII, ou seja, de suporte de linfócitos. Ficou também aparente que o tratamento diário ou o tipo de veículo usado não pareceram causar estresse significativo nos animais sadios ou injetados com AFC (figura 22) e que o EHPp não alterou os níveis basais (normais) de células Mac-1⁺ dos animais (figura 23). Mais importante ainda foi a demonstração que o tratamento com EHPp reduziu os níveis de células Mac-1⁺ nos baços de animais tratados com AFC a níveis próximos dos animais sadios (figuras 24 e 26). Resultados preliminares mostram que o tratamento com EHPp reduziu drasticamente o número de células Mac-1⁺ ativadas nesse órgão, como medido pela sonda para detecção de radicais livres (figura 27). Estes resultados mostram que o EHPp não só interfere na mielopoiese, bem como reduz a ativação das células Mac-1⁺ esplênicas e conseqüentemente o seu suporte (i.e., apresentação de antígenos, e produção de citocinas e fatores quimiotáticos) necessário à ativação e migração de linfócitos envolvidos no desenvolvimento da CIA ou mesmo à sua própria participação inflamatória nas articulações (i.e., produção de mediadores inflamatórios, enzimas destruidoras de matriz e radicais livres, prostaglandinas, ativação de complemento, etc).

Efeito do tratamento com EHPp na geração de células Mac-1⁺ nos baços de animais injetados com CIA.

Causou surpresa a semelhança do percentual de células Mac-1⁺ em animais com CIA tratados com etanol 15% ou EHPp (figura 28). Não temos interpretação para esta observação. Contudo, como este modelo é mais longo e apresenta duas ondas de elevação de células Mac-1⁺, a primeira com máximos entre os dias 5 e 10 e a segunda entre os dias 35 e 50 (Matthys *et al.*, 1999), é possível que a segunda onda, diferente da primeira, receba um suporte maior de citocinas (GM-CSF, G-CSF) proveniente de linfócitos ativados por CII. Cabe mencionar que os baços de animais com CIA pelo 48^o -51^o dia de experimento (dia do sacrifício) apresentam quase o dobro de células em relação aos animais sadios sem indução de CIA. Também demonstrado por Matthys e colaboradores (1999) e Campbell e colaboradores (2001). Não foram avaliados os pesos dos baços dos diferentes grupos. Resultados também preliminares mostraram que a maioria das células Mac-1⁺ são Gr.1 positivas (granulócitos). Embora ainda não tenhamos avaliado o percentual de monócitos/macrófagos nas mesmas (Anticorpo F4/80), este perfil parece ser similar ao encontrado por Matthys e colaboradores (1999).

Mecanismos intercelulares envolvidos na resposta imunoinflamatória da CIA onde o EHPp poderia estar interferindo.

Inúmeros trabalhos têm mostrado como podemos interferir especificamente no desenvolvimento da CIA em diferentes vias, compartimentos e moléculas envolvidas neste modelo. Alguns exemplos constam nos quadros a seguir:

Quadro 7a. Desenvolvimento da CIA em diferentes vias, compartimentos e moléculas envolvidas neste modelo (continua).

Marcação de Ativação	Referência Bibliográfica
Ac anti-molécula de adesão	The effect of anti-adhesion molecule antibody on the development of collagen-induced arthritis. <i>Cell Immunol.</i> , v.142, n.2, p.326-337, 1992.
Ac anti-gp 39, ligante para CD40	Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. <i>Science</i> , v.261, n.5126, p.1328-1330, 1993.

Quadro 7b. Desenvolvimento da CIA em diferentes vias, compartimentos e moléculas envolvidas neste modelo (conclusão).

TCR	
Ac anti-T cell receptor antibody	Anti-T cell receptor antibody treatment of rats with established autologous collagen-induced arthritis: suppression of arthritis without reduction of anti-type II collagen autoantibody levels. <i>Eur. J. Immunol.</i> , v.21, n.5, p.1327-1330, 1991.
ECM	
Ac anti-CD44	Administration of antibodies to hyaluronanreceptor (CD44) delays the start and ameliorates the severity of collagen II arthritis. <i>Scand. J. Immunol.</i> , v.42, n.3, p.353-358, 1995.
PLAQUETAS	
Antagonista de Fator ativador de plaquetas	A platelet activating factor receptor antagonist prevents the development of chronic arthritis in mice. <i>J. Rheumatol.</i> , v.26, n.5, p.1080-1086, 1999.
Trombina	Amelioration of collagen-induced arthritis by thrombin inhibition. <i>J. Clin. Invest.</i> , v.107, n.5, p.631-640, 2001.
ANGIOGÊNESE	
	Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis. <i>J. Exp. Med.</i> , v.174, n.4, p.1135-1138, 1992.
CITOCINAS	
TNF-alfa	Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , v.89, n.20, p.9784-9788, 1992.
INF-beta	The effects of interferon beta treatment on arthritis. <i>Rheumatology (Oxford)</i> , v.38, n.4, p.362-369, 1999.
IL-1	Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. <i>Clin. Exp. Immunol.</i> , v.95, n.2, p.237-243, 1994.
IL-13	Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by treatment with vector cells engineered to secrete interleukin-13. <i>Eur. J. Immunol.</i> , v.26, n.10, p.2399-2403, 1996.
IL-15	Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. <i>J. Immunol.</i> , v.160, n.11, p.5654-5660, 1998.
COMPLEMENTO	
Ac anti-C5	Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , v.92, n.19, p.8955-8959, 1995.
CD	
CD4	Prevention of type II collagen-induced arthritis by <i>in vivo</i> treatment with anti-L3T4. <i>J. Exp. Med.</i> , v.162, n.3, p.1105-1110, 1985.
TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE CÉLULAS	
Linfócito T CD25 ⁺	Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25 ⁺ regulatory T cells. <i>Arthritis Rheum.</i> , v.52, n.7, p.2212-2221, 2005.

Quadro 8. Moléculas importantes na melhora e/ou supressão da CIA.

MARCAÇÃO DE ATIVAÇÃO	Referência Bibliográfica
CD23	Importance of CD23 for collagen-induced arthritis: delayed onset and reduced severity in CD23-deficient mice. <i>J. Immunol.</i> , v.162, n.7, p.4266-4270, 1999.
CD28	CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. <i>J. Immunol.</i> , v.162, n.1, p.203-208, 1999.
Intercellular adhesion molecule-1	Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1. <i>J. Immunol.</i> , v.157, n.7, p.3153-3158, 1996.
Anti-CD5	Anti-CD5 therapy decreases severity of established disease in collagen type II-induced arthritis in DBA/1 mice. <i>Clin. Exp. Immunol.</i> , v.98, n.3, p.442-447, 1994.
HORMÔNIOS	
Femininos	Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. <i>Arthritis Rheum.</i> , v.29, n.12, p.1501-1509, 1986.
Gravidez	Exposure of female mice to type II collagen reduces susceptibility to collagen-induced arthritis in offspring. <i>Eur. J. Immunol.</i> , v.20, n.9, p.2149-2152, 1990.
NEUROIMUNOMODULAÇÃO	
Estresse por barulho	Exacerbation of collagen arthritis by noise stress. <i>J. Rheumatol.</i> , v.10, n.4, p.651-654, 1983.
Escuridão constante	Constant darkness enhances autoimmunity to type II collagen and exaggerates development of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. <i>J. Neuroimmunol.</i> , v.27, n.1, p.79-84, 1990.
QUIMIOCINAS	
Antagonista de receptores de quimiocinas	Effect of a CC chemokine receptor antagonist on collagen induced arthritis in DBA/1 mice. <i>Immunol. Lett.</i> , v.57, n.1-3, p.117-120, 1997.

Quadro 9. Citocinas que aumentam a CIA.

	Referência Bibliográfica
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor exacerbates collagen induced arthritis in mice. <i>Ann. Rheum. Dis.</i> , v.56, n.6, p.364-368, 1997.
IL-1	<i>In vivo</i> administration with IL-1 accelerates the development of collagen-induced arthritis in mice. <i>J. Immunol.</i> , v.141, n.3, p.834-841, 1988.
IL-2	Immunosuppression of collagen-induced arthritis in mice with an anti-IL-2 receptor antibody. <i>J. Immunol.</i> , v.141, n.4, p.1150-1154, 1988.
IL-6	Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. <i>Arthritis Rheum.</i> , v.41, n.12, p.2117-2121, 1998.
IL-15	Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. <i>J. Immunol.</i> , v.160, n.11, p.5654-5660, 1998.
IL-17	Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. <i>J. Immunol.</i> , v.171, n.11, p.6173-6177, 2003.
IL-18	A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. <i>J. Clin. Invest.</i> , v.104, n.10, p.1393-1401, 1999.

Quadro 10. Citocinas que diminuem a CIA.

	Referência Bibliográfica
TGF-beta	Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , v.88, n.7, p.2918-2921, 1991.
IL-4	Suppression of collagen-induced arthritis by continuous administration of IL-4. <i>J. Immunol.</i> , v.159, n.11, p.5687-5696, 1997.
IL-11	An anti-inflammatory role for interleukin-11 in established murine collagen-induced arthritis. <i>Immunology</i> , v.95, n.1, p.31-37, 1998.
IL-10	Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. <i>Arthritis Rheum.</i> , v.39, n.3, p.495-503, 1996.

Desta forma, parece aqui inoportuno divagar sobre em qual ou quais desse(s) ponto(s) EHPp poderia estar interferindo. O trabalho de Matthys e colaboradores (1999) destaca um papel importante do AFC como provável indutor da secreção de IL-6 e IL-12 no desenvolvimento da CIA e do IFN γ (citocina padrão da resposta Th1) no controle negativo da hematopoese extramedular esplênica. Assim, a avaliação destas citocinas, bem como de citocinas Th2 (e.g. IL-10), são alvos obrigatórios de estudos futuros. Avaliação de células regulatórias negativas CD4⁺CD3⁻ (subpopulação de célula dendrítica; Lane *et al.*, 2005), CD8⁺ (Myers *et al.*, 2005) e CD4⁺ CD25⁺ (Maloy & Powrie, 2001) também se fazem necessárias. Interessante, as células reguladoras CD8⁺ (via TGF β) como as CD4⁺ CD25⁺ dependem de IFN γ para exercer o seu efeito supressor (Myers *et al.*, 2005; Kelchtermans *et al.*, 2005, respectivamente), no último caso na CIA. Da mesma maneira, isolamento das

células Mac-1⁺ de animais tratados com EHPp podem permitir a análise molecular das mesmas.

Que substâncias presentes no extrato poderiam promover o efeito terapêutico de EHPp na CIA?

Trabalho anterior usando as espécies *P. emarginatus* e *P. polygalaeflorus*, responsabilizaram derivados do vouacapan (furano-diterpenos tetra-cíclicos) pela capacidade anti-inflamatória encontradas nas sementes dessas árvores (Nunan *et al.*, 1982). Contudo, o óleo das sementes de *P. polygalaeflorus* exibe uma mistura muito complexa com álcoois de cadeia longa, sesquiterpenos não cíclicos, sesquiterpenos monocíclicos, diterpenos acíclicos, diterpenos tri- e tetra-cíclicos, a maioria dos quais ainda não caracterizada. Nosso grupo recentemente identificou no óleo de sementes de *P. pubescens* por GC/MS ou NMR, alguns compostos majoritários como derivados do vouacapan e os sesquiterpeno acíclicos farnesol and geranilgeraniol. Importante, subfrações ainda complexas desse óleo, enriquecida em derivados do vouacapan ou em farnesol, foram bastante ativas em impedir o edema plantar induzido por carragenina (0,1 mg/kg) e o edema de orelha induzido por óleo de cróton (0,1 mg/orelha) em camundongos. Uma terceira fração composta somente por geranilgeraniol foi bastante ativo (na ordem de 0,1 ng/orelha) somente no último ensaio (Silva *et al.*, 2004). Adicionalmente, experimentos usando o modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos, revelaram uma forte inibição da infiltração pleural de leucócitos após tratamento com dose única das fração enriquecida em vouacapans ou da fração geranilgeraniol, ambas com a melhor dose em 0,1 mg/kg (resultados não publicados). Portanto, embora existam outras substâncias presentes em duas dessas frações, os compostos mencionados são os primeiros candidatos para a atividade anti-edematogênica e anti-inflamatória exibida nesses modelos, bem como na CIA. É importante lembrar que a semente de sucupira é bastante oleosa e o tratamento da CIA foi realizado com extratos aquosos (15% etanol), enquanto as frações acima citadas foram obtidas a partir do óleo extraído com etanol absoluto. Ainda assim, acreditamos que pelo longo tempo de

extração (15 dias) e pela presença do álcool a 15%, os extratos parecem possuir muitas das substâncias mencionadas. Extração dos extratos hidroalcoólicos liofilizados com etanol absoluto nos responderá isso.

Especulação sobre os mecanismos bioquímicos de ação de substâncias presentes no óleo (e extrato aquoso?) da Sucupira.

Farnesilação e/ou geranylgeranilação representam modificações pós-traducionais requeridas para o processamento de proteínas nas membranas celulares, permitindo assim desempenhar o seu papel em processos de sinalização ou catálise. Drogas que inibem essas prenilações, como as estatinas, têm sido demonstrado que aumentam a expressão de ciclooxigenase-2 e a formação de prostaciclina por células de músculo liso de aortas humanas, o efeito sendo revertido pela adição de geranylgeranyl-pirofosfato (Degraeve *et al.*, 2001).

Portanto, não podemos descartar a possibilidade de que um oferecimento contínuo de precursores de prenilação (ex. farnesol e geranylgeraniol), presentes no EHPp, possam estar afetando negativamente eventos de sinalização envolvidos no desenvolvimento da CIA, tais como a produção de prostaglandinas. Curiosamente, extratos de sucupira são capazes de inibir a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico em plasma de coelho (resultados não publicados). Contudo, para que a hipótese de atuação da sucupira na prenilação seja válida, farnesol e geranylgeraniol deveriam estar na forma funcional de pirofosfato. Hepatócitos possuem pelo menos uma enzima que leva à formação de farnesil pirofosfato (Bentinger *et al.*, 1998).

5 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados ratificam o uso popular de infusões com sementes de sucupira, no presente caso de *P. polygalaeflorus*, no tratamento de Artrite Reumatóide humana e se somam aos anteriormente obtidos por nosso grupo para a *Pterodon pubescens*, outra variedade de sucupira (Sabino *et al.*, 1999a; Pinto-Coelho *et al.*, 2004). Assim, o extrato hidroalcoólico de *Pterodon pubescens* e de *P. polygalaeflorus* despontam com potencial uso na medicina alternativa e complementar, não só para o tratamento da AR e outras situações inflamatórias, como também atestam dados do nosso grupo usando outros modelos de inflamação (Silva *et al.*, 2004), bem como em outras situações de imunidade crônica, como doenças autoimunes degenerativas (ex. espondilite, lupus) e estados de rejeição à transplantes. A aparente falta de efeitos colaterais em camundongos (Pinto-Coelho *et al.*, 2001) também indica o extrato hidroalcoólico de *Pterodon* para ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

ABDEL-NASSER, A.M., RASKER, J.J., VALKENBURG, H.A. Epidemiological and clinical aspects relating to the variability of rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.*, v.27, n.2, p.123-140, Oct.1997.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Resolução RDC no. 48, de 16 de março de 2004*. Normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos. 2004.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *HerbalGram*, v.28, p.13-19, 1993.

ARRIAGA, A.M.C., CASTRO, M.A.B., SILVEIRA, E.R., BRAZ-FILHO, R. Further diterpenoids isolated from *Pterodon poligalaeflorus*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.11, n.2, p.187-190, Mar./Apr. 2000.

BAKKER, N.P., VAN ERCK, M.G., BOTMAN, C.A., JONKER, M., 'T HART, B.A. Collagen-induced arthritis in an outbred group of rhesus monkeys comprising responder and nonresponder animals. Relationship between the course of arthritis and collagen-specific immunity. *Arthritis Rheum.*, v.34, n.5, p.616-624, May 1991.

BARTON, A., OLLIER, W. Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v.14, n.3, p.260-269, May 2002.

BAUER, K., YU, X., WERNHOFF, P., KOCZAN, D., THIESEN, H.J., IBRAHIM, S.M. Identification of new quantitative trait loci in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, v.50, n.11, p.3721-3728, Nov. 2004.

BENTINGER, M., GRUNLER, J., PETERSON, E., SWIEZEWSKA, E., DALLNER, G. Phosphorylation of farnesol in rat liver microsomes: properties of farnesol kinase and farnesyl phosphate kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.353, p.191-198, May 1998.

BLUMENTHAL, M. Harvard study estimates consumers spend \$5.1 billion on herbal products? *HerbalGram*, v.45, p.68, 1999a.

BLUMENTHAL, M. Herb industry sees mergers, acquisitions, and entry by pharmaceutical giants in 1998. *HerbalGram*, v.45, p.67, 1999b.

BORCHERS, A.T., SAKAI, S., HENDERSON, G.L., HARKEY, M.R., KEEN, C.L., STERN, J.S., TERASAWA, K., GERSHWIN, M.E. Shosaiko-to and other Kampo (Japanese herbal) medicines: a review of their immunomodulatory activities. *J. Ethnopharmacol.*, v.73, n.1-2, p.1-13, Nov. 2000.

BRAZ-FILHO, R., GOTTLIEB, O.R., ASSUMPÇÃO, R.M.V. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. *Phytochemistry*, v.10, p.2835-2836, 1971.

BRUNSBERG, U., GUSTAFSSON, K., JANSSON, L., MICHAELSSON, E., AHLUND-RICHTER, L., PETTERSSON, S., MATTSSON, R., HOLMDAHL, R. Expression of a transgenic class II Ab gene confers susceptibility to collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.*, v.24, n.7, p.1698–1702, July 1994.

BUDD, R.C., CEROTTINI, J.C., HORVATH, C., BRON, C., PEDRAZZINI, T., HOWE, R.C., MACDONALD, H.R. Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J. Immunol.*, v.138, n.10, p.3120-3129, May 1987.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.33, p.179-189, Feb. 2000.

CALIXTO, J.B. Medicamentos Fitoterápicos. In: Yunes RA, Calixto JB. *Plantas Mediciniais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001. p.297-315.

CAMBIAGGI, C., SCUPOLI, M.T., CESTARI, T., GEROSA, F., CARRA, G., TRIDENTE, G., ACOLLA, R.S. Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12. *Immunogenetics*, v.36, n.2, p.117-120, 1992.

CAMPBELL, J.K., KRISTY, O'D., KATE, E.L., IAN, P.W. Severe inflammatory arthritis and lymphadenopathy in the absence of TNF. *J. Clin. Invest.*, v.107, p.1519-1527, June 2001.

CAMPOS, A.M., SILVEIRA, E.R., BRAZ-FILHO, R., TEIXEIRA, T.C. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. *Phytochemistry*, v.36, n.2, p.403-406, 1994.

CARLSÉN, S., HANSSON, A.S., OLSSON, H., HEINEGÅRD, D., HOLMDAHL, R. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats. *Clin. Exp. Immunol.*, v.114, p.477-484, Dec. 1998.

CARRIL, M.S., ARAGON, J.P., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. Age-related accumulation of memory cells in mouse Peyer's patches. *Immunol. Lett.*, v.83, n.1, p.39-45, Aug. 1, 2002.

CARVALHO, J.C.T., SERTIÉ, J.A.A., BARBOSA, M.V.J., PATRÍCIO, K.C.M., CAPUTO, L.R.G., SARTI, S.J., FERREIRA, L.P., BASTOS, J.K. Anti-inflammatory activity of the crude extract from fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *J. Ethnopharmacol.*, v.64, n.2, p.127-133, Feb. 1999.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, v.52, n.9, p.1361-1371, Sept. 2003.

CHANG, J. Medicinal herbs: drugs or dietary supplements? *Biochem. Pharmacol.*, v.59, n.3, p.211 -219, Feb. 2000.

COELHO, L.P., REIS, P.A., DE CASTRO, F.L., GAYER, C.R.M., LOPES, C.S., DA COSTA E SILVA, M.C., SABINO, K.C.C., TODESCHINI, A.R., COELHO, M.G.P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J. Ethnopharmacol.*, v.98, n.1-2, p.109-116, Apr. 8, 2005.

COIMBRA, R. *Notas de Fitoterapia*. Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia. Rio de Janeiro: Carlos da Silva Araújo, 1942. p.222.

CORREA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, vol. III, 1984. p.129.

CORTHAY, A., BÄCKLUND, J., BRODDEFALK, J., MICHAËLSSON, E., GOLDSCHMIDT, T.J., KIHLEBERG, J., HOLMDAHL, R. Epitope glycosylation plays a critical role for T cell recognition of type II collagen in collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.*, v.28, p.2580–2590, Aug. 1998.

COURTENAY, J.S., DALLMAN, M.J., DAYAN, A.D., MARTIN, A., MOSEDALE, B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*, v.283, n.5748, p.666-668, Feb. 14, 1980.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, v.60, p.52-60, Jan. 1997.

CRUZ, G.L. *Livro Verde das Plantas Mediciniais e Industriais do Brasil*. Belo Horizonte: Rodomonte, 1965. p.779-780.

DE KLERCK, B., CARPENTIER, I., LORIES, R.J., HABRAKEN, Y., PIETTE, J., CARMELIET, G., BEYAERT, R., BILLIAU, A., MATTHYS, P. Enhanced osteoclast development in collagen-induced arthritis in interferon-gamma receptor knock-out mice as related to increased splenic CD11b+ myelopoiesis. *Arthritis Res. Ther.*, v.6, n.3, p.R220-31, 2004.

DE SMET, P.A. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs*, v.54, n.6, p.801-840, Dec. 1997.

DE SMET, P.A. Herbal medicine in Europe- relaxing regulatory standards. *N. Engl. J. Med.*, v.352, n.12, p.1176-1178, Mar. 24, 2005.

DEGRAEVE, F., BOLLA, M., BLAIE, S., CREMINON, C., QUERE, I., BOQUET, P., LEVY-TOLEDANO, S., BERTOGLIO, J., HABIB, A. Modulation of COX-2 expression by statins in human aortic smooth muscle cells. Involvement of geranylgeranylated proteins. *J. Biol. Chem.*, v.276, n.50, p.46849-46855, Dec. 14, 2001.

DIAS, F.L., TAKAHASHI, C.S., SAKAMOTO-HOJO, E.T., VICHNEWSKI, W., SARTI, S.J. Genotoxicity of the natural cercaricides "Sucupira" oil and eremanthine in mammalian cell *in vitro* and *in vivo*. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.26, n.4, p.338-344, 1995.

DORAN, M.F., CROWSON, C.S., POND, G.R., O'FALLON, W.M., GABRIEL, S.E. Predictors of infection in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, v.46, n.9, p.2294-2300, Sept. 2002.

DOS SANTOS FILHO, D., VICHNEWSKI, W., BAKER, P.M., GILBERT, B. Prophylaxis of Schistosomiasis: Diterpenes from *Pterodon pubescens* Benth. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v.44, n.1, p.45-49, 1972.

DU MONTCEL, S.T., MICHOU, L., PETIT-TEIXEIRA, E., OSORIO, J., LEMAIRE, I., LASBLEIZ, S., PIERLOT, C., QUILLET, P., BARDIN, T., PRUM, B., CORNELIS, F., CLERGET-DARPOUX, F. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum.*, v.52, n.4., p.1063-1068, Apr. 2005.

DUARTE, I.D.G., FERREIRA-ALVES, D.L., NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. *Life Sci.*, v.50, n.12, p.891-897, 1992.

DUARTE, I.D.G., FERREIRA-ALVES, D.L., VELOSO, D.P., NAKAMURA-CRAIG, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacaoan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. *J. Ethnopharmacol.*, v.55, n.1, p.13-18, Dec. 1996.

EDITORIAL THE LANCET. Pharmaceuticals from plants: great potential, few founds. *Lancet.*, v.343, n.8912, p.1513-1515, June 1994.

FASCIO, M., MORS, W.B., GILBERT, B., MAHAJAN, J.R., MONTEIRO, M.B., DOS SANTOS FILHO, D., VICHNEWSKI, W. Diterpenoid furans from *Pterodon* species. *Phytochemistry*, v.15, p.201-203, 1976.

FELDMANN, M., BRENNAN, F.M., MAINI, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.*, v.14, p.397-440, 1996.

FELDMANN, M., ELLIOT, M.J., WOODY, J.N., MAINI, R.N. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy of rheumatoid arthritis. *Adv. Immunol.*, v.64, p.283-350, 1997.

FELSON, D.T., ANDERSON, J.J., BOERS, M., BOMBARDIER, C., FURST, D., GOLDSMITH, C., KATZ, L.M., LIGHTFOOT, R. Jr., PAULUS, H., STRAND, V., *et al.* American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, v.38, n.6, p.727-735, June 1995.

FINCH, W.R. Mortality in rheumatoid disease. *J. Insur. Med.*, v.36, n.3, p.200-212, 2004.

FUGGER, L., ROTHBARD, J.B., SONDERSTRUP-MCDEVITT, G. Specificity of an HLA-DRB1*0401-restricted T cell response to type II collagen. *Eur. J. Immunol.*, v.26, n.4, p.928-933, Apr. 1996.

GILBERT, B., DE SOUZA, J.P., FASCIO, M., KITAGAWA, M., NASCIMENTO, S.S.C., FORTES, C.C., SEABRA, A.P., PELLEGRINO, J. Esquistossomose: Proteção contra infecção por terpenóides. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v.42, p.397-400, 1970.

GLANT, T.T., MIKECZ, K., ARZOUMANIAN, A., POOLE, A.R. Proteoglycan-induced arthritis in Balb/c mice. *Arthritis Rheum.*, v.30, n.2, p.201-212, Feb. 1987.

GRÜNWARD, J. The European Phytomedicines market: figures, trends, analysis. *HerbalGram*, v.34, p.60-65, 1995.

GU, W.Z., BRANDWEIN, S.R. Inhibition of type II collagen-induced arthritis in rats by triptolide. *Int. J. Immunopharmacol.*, v.20, n.8, p.389-400, Aug. 1998.

HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v.30, n.12, p.3864-3874, 1991.

HOLMDAHL, R., JANSSON, L., GULLBERG, D., RUBIN, K., FORSBERG, P.O., KLARESKOG, L. Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clin. Exp. Immunol.*, v.62, n.3, p.639-646, Dec. 1985.

HOLMDAHL, R., JONSSON, R., LARSSON, P., KLARESKOG, L. Early appearance of activated CD4+ T lymphocytes and class II antigen-expressing cells in joints of DBA/1 mice immunized with type II collagen. *Lab. Invest.*, v.58, n.1, p.53-60, Jan. 1988.

HOLMDAHL, R., BOCKERMANN, R., BÄCKLUND, J., YAMADA, H. The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice - a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res. Rev.*, v.1, n.1, p.135-147, Feb. 2002.

JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M., CAPRA, J.D. Apêndice I – Antígenos CD. In: *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. Tradução por Denise Cantarelli Machado *et al.* 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas do Sul, 2000. p.579-587.

KATO, F., NOMURA, M., NAKAMURA, K. Arthritis in mice induced by a single immunisation with collagen. *Ann. Rheum. Dis.*, v.55, n.8, p.535-539, Aug. 1996.

KATZ, N., DOS SANTOS FILHO, D., SARTI, S.J., MENDES, N.M., ROCHA FILHO, P.A., ARAUJO, N. Chemoprophylactic activity on Schistosomiasis mansoni of soaps containing essential oil from the fruits of *Pterodon pubescens*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.35, n.2, p.183-191, mar-abr. 1993.

KELCHTERMANS, H., DE KLERCK, B., MITERA, T., VAN BALEN, M., BULLENS, D., BILLIAU, A., LECLERCQ, G., MATTHYS, P. Defective CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res. Ther.*, v.7, n.2, p.R402-15, 2005.

KIM, W.U., YOO, W.H., PARK, W., KANG, Y.M., KIM, S.I., PARK, J.H., LEE, S.S., JOO, Y.S., MIN, J.K., HONG, Y.S., LEE, S.H., PARK, S.H., CHO, C.S., KIM, H.Y. IgG antibodies to type II collagen reflect inflammatory activity in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, v.27, n.3, p.575-581, Mar. 2000.

KIMPEL, D., DAYTON, T., FUSELER, J., GRAY, L., KANNAN, K., WOLF, R.E., GRISHAM, M. Splenectomy attenuates streptococcal cell wall-induced arthritis and alters leukocyte activation. *Arthritis Rheum.*, v.48, n.12, p.3557-3567, Dec. 2003.

KU, C.C., MURAKAMI, M., SAKAMOTO, A., KAPPLER, J., MARRACK P. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science*, v.288, n.5466, p.675-678, Apr. 28, 2000.

KVALVIK, A.G., JONES, M.A., SYMMONS, D.P. Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992. *Scand. J. Rheumatol.*, v.29, n.1, p.29-37, 2000.

LANE, P.J., GASPAL, F.M., KIM, M.Y. Two sides of a cellular coin: CD4⁺ CD3⁻ cells regulate memory responses and lymph-node organization. *Nat. Rev. Immunol.*, v.5, n.8, p.655-660, Aug. 2005.

LAWRENCE, R.N. Rediscovering natural product biodiversity. *Drug. Discov. Today*, v.4, n.10, p.449-451, Oct. 1999.

LEAL, L.K., FERREIRA, A.A., BEZERRA, G.A., MATOS, F.J., VIANA, G.S. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J. Ethnopharmacol.*, v.70, n.2, p.151-159, May 2000.

LEE, D.M., WEINBLATT, M.E. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, v.358, n.9285, p.903-911, Sept. 2001.

LESLEY, J., SCHULTE, R., TROTTER, J., HYMAN, R. Qualitative and quantitative heterogeneity in Pgp-1 expression among murine thymocytes. *Cell Immunol.*, v.112, n.1, p.40-54, 1988.

LIMA, O.C., FIGUEIREDO, C.C., PEREIRA, B.A.S., PINTO-COELHO, M.G., MORANDI, V., LOPES-BEZERRA, L.M. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, n.5, p.651-657, May 1999.

LINOS, A., WORTHINGTON, J.W., O'FALLON, W.M., KURLAND, L.T. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota: a study of incidence, prevalence, and mortality. *Am. J. Epidemiol.*, v.111, n.1, p.87-98, 1980.

LIPSKY, P.E. Rheumatoid Arthritis. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 13. ed. Estados Unidos da América: McGraw-Hill, 1994. p.1648-1655.

MACGREGOR, A.J., SNIEDER, H., RIGBY, A.S., KOSKENVUO, M., KAPRIO, J., AHO, K., SILMAN, A.J. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.*, v.43, n.1, p.30-37, Jan. 2000.

MAHAJAN, J.R., MONTEIRO, M.B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. *An. Ac. Bras. Ciênc.*, v.42, p.103-106, 1970.

MALMSTRÖM, V., TROLLMO, C., KLARESKOG, L. The additive role of innate and adaptive immunity in the development of arthritis. *Am. J. Med. Sci.*, v.327, n.4, p.196-201, Apr. 2004.

MALOY, K.J., POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.*, v.2, n.9, p.816-822, 2001.

MATTHYS, P., VERMEIRE, K., MITERA, T., HEREMANS, H., HUANG, S., SCHOLS, D., DE WOLF-PEETERS, C., BILLIAU, A. Enhanced autoimmune arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice is conditioned by mycobacteria in Freund's adjuvant and by increased expansion of Mac-1⁺ myeloid cells. *J. Immunol.*, v.163, n.6, p.3503-3510, Sept. 15, 1999.

MATTHYS, P., VERMEIRE, K., HEREMANS, H., BILLIAU, A. The protective effect of INF- γ in experimental autoimmune diseases: a central role of mycobacterial adjuvant-induced myelopoiesis. *J. Leukoc. Biol.*, v.68, n.4, p.447-454, Oct. 2000.

MATTHYS, P., LORIES, R.J., DE KLERCK, B., HEREMANS, H., LUYTEN, F.P., BILLIAU, A. Dependence on interferon-gamma for the spontaneous occurrence of arthritis in DBA/1 mice. *Arthritis Rheum.*, v.48, n.10, p.2983-2988, Oct. 2003.

MAURI, C., WILLIAMS, R.O., WALMSLEY, M., FELDMANN, M. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.*, v.26, n.7, p.1511–1518, July 1996.

MELANSON, P.M., DOWNE-WAMBOLDT, B. Confronting life with rheumatoid arthritis. *J. Adv. Nurs.*, v.42, n.2, p.125-133, Apr. 2003.

MICHAËLSSON, E., ANDERSSON, M., ENGSTRÖM, A., HOLMDAHL, R. Identification of an immunodominant type-II collagen peptide recognized by T cells in H-2q mice: self tolerance at the level of determinant selection. *Eur. J. Immunol.*, v.22, n.7, p.1819–1825, July 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares PMNPC*. Resumo executivo. Brasília, fevereiro de 2005.

MORS, W.B., PELLEGRINO, J., DOS SANTOS FILHO, M.F. Ação profilática do óleo dos frutos de Sucupira-Branca, *Pterodon pubescens Benth.*, contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, v.38, p.325-330, 1966.

MORS, W.B., DOS SANTOS FILHO, F., MONTEIRO, H.J., GILBERT, B., PELLEGRINO, J. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14,15-epoxygeranylgeraniol. *Science.*, v.157, n.3791, p.950-951, 1967.

MYERS, L., CROFT, M., KWON, B.S., MITTLER, R.S., VELLA, A.T. Peptide-specific CD8 T regulatory cells use IFN-gamma to elaborate TGF-beta-based suppression. *J. Immunol.*, v.174, n.12, p.7625-7632, June 2005.

MYERS, L.K., ROSLONIEC, E.F., CREMER, M.A., KANG, A.H. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci.*, v.61, n.19, p.1861-1878, 1997.

NEARING, M. The green pharmacy. Herbal medicines in modern usage. *IDRC Rep.*, v.14, n.1, p.10-11, Apr. 1985.

NETO, J.J. Contribuição ao estudo farmacognóstico dos frutos de *Pterodon pubescens* (Benth) Benth. Parte III – Identificação cromatográfica em fase gasosa, química e ação microbiológica do óleo do fruto. *Rev. Fac. Farm. Odontol.*, v.10, n.2, p.317-327, 1976.

NUNAN, E.A., CARVALHO, M.G., PILÓ-VELOSO, D., TURCHETTI-MAIA, R.M.M., FERREIRA-ALVES, D.L. Furane diterpenes with anti and pro-inflammatory activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.15, p.450, 1982.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicine*. Genebra, 1993. p.1.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005*. Genebra, 2002. p.78.

PENNA, M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 1946. p.64-65.

PETROVICK, P.R., MARQUES, L.C., DE PAULA, I.C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v.66, n.1, p.51-55, July 1999.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, v.56, n.3, p.237-243, Feb. 2001.

PINCUS, T.E., BROOKS, R.H., CALLAHAN, L.F. Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple quationnaire and koint count measures. *Ann. Intern. Med.*, v.120, n.1, p.26-34, Jan. 1, 1994.

PINTO-COELHO, M.G., MARQUES, P.R., GAYER, C.R.M., VAZ, L.C.A., NOGUEIRA NETO, J.F., SABINO, K.C.C. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *P. pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. *J. Etnopharmacol.*, v.77, n.2-3, p.159-164, Oct. 2001.

PINTO-COELHO, M.G., SABINO, K.C.C., DALMAU, S.R. Immunomodulatory effects of sucupira (*P.pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, v.22, n.2, p.213-218, Mar-Apr. 2004.

PUGNER, K.M., SCOTT, D.I., HOLMES, J.W., HIEKE, K. The costs of rheumatoid arthritis: an international long-term riview. *Semin. Arthritis Rheum.*, v.29, n.5, p.305-320, Apr. 2000.

RANGES, G.E., SRIRAM, S., COOPER, S.M. Prevention of type II collagen-induced arthritis by *in vivo* treatment with anti-L3T4. *J. Exp. Med.*, v.162, n.3, p.1105–1110, Sept. 1985.

ROSENBERG, A.E. Ossos, Articulações e Tumores de Tecidos Moles. In: KUMAR V., ABBAS A.K., FAUSTO N. [tradução Maria da Conceição Zacharias...et al.]. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.1365-1369.

SABINO, K.C.C., GAYER, C.R.M., VAZ, L.C.A., SANTOS, L.R.L., FELZENSZWALD, I., PINTO-COELHO, M.G. *In vitro* and *in vivo* toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil. *Toxicol. Lett.*, v.108, n.1, p.27-35, July 30, 1999a.

SABINO, K.C.C., CASTRO, F.A., OLIVEIRA, J.C.R., DALMAU, S.R.A., PINTO-COELHO, M.G. Successful therapy of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcoholic extract of seeds of *P.pubescens*. *Phytother. Res.*, v.13, n.7, p.613-615, Nov. 1999b.

SABINO, K.C.C. Estudos imunofarmacológicos e toxicológicos de extratos de sementes de *Pterodon Pubescens* [tese]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2001. 139p.

SANTOS FILHO, D., SARTI, S.J., KATZ, N., ARAÚJO, N., ROCHA FILHO, P.A., ABREU, J.E., BORTOLIN, M.E. Chemoprophylactic activity of soaps containing essential oil from the fruit of *Pterodon pubescens* in schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.82, n.4, p.343-345, 1987.

SEARA, S.N. Fracionamento de extrato oleoso de sementes de *Pterodon pubescens* (EOPp) com atividade biológica [Monografia]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 1997.

SEKI, N., SUDO, Y., YOSHIOKA, T., SUGIHARA, S., FUJITSU, T., SAKUMA, S., OGAWA, T., HAMAOKA, T., SENOH, H., FUJIWARA, H. Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J. Immunol.*, v.140, n.5, p.1477-1484, Mar. 1, 1988.

SHELLEKENS, G.A., DE JONG, B.A., VAN DEN HOOGEN, F.H., VAN DE PUTTE, L.B., VAN VENROOIJ, W.J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.*, v.101, n.1, p.273-281, Jan. 1, 1998.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, v.61, n.8, p.1053-1071, Aug. 1998.

SIANI, A.C. *Desenvolvimento Tecnológico de Fitoterápicos: Plataforma Metodológica*. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003. p.97.

SILVA, M.C.C., GAYER, C.R.M., LOPES, C.S., CALIXTO, N.O., REIS, P.A., PASSAES, C.P.B., PAES, M.C., DALMAU, S.R., SABINO, K.C.C., TODESCHINI, A.R., PINTO-COELHO, M.G. Acute and Topic Anti-inflammatory Fractions Isolated from the Seeds of *P.pubescens*. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.56, n.1, p.135-141, Jan. 2004.

SPRENT, J. Immunological memory. *Curr. Opin. Immunol.*, v.9, n.3, p.371-379, June 1997.

SVENSSON, L., JIRHOLT, J., HOLMDAHL, R., JANSSON, L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin. Exp. Immunol.*, v.111, n.3, p.521-526, Mar. 1998.

SWEENEY, S.E., FIRESTEIN, G.S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.36, n.3, p.372-378, Mar. 2004.

SYMMONS, D., HARRISON, B. Early inflammatory polyarthritis: results from the norfolk arthritis register with a review of the literature. I. Risk factors for the development of inflammatory polyarthritis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, v.39, n.8, p.835-843, Aug. 2000.

SYMMONS, D.P., BARRETT, E.M., BANKHEAD, C.R., SCOTT, D.G., SILMAN, A.J. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. *Br. J. Rheumatol.*, v.33, n.8, p.735-39, Aug. 1994.

TADA, Y., HO, A., KOH, D.R., MAK, T.W. Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J. Immunol.*, v.156, n.11, p.4520-4526, June 1996.

TARKOWSKI, A., KLARESKOG, L., CARLSTEN, H., HERBERTS, P., KOOPMAN, W.J. Secretion of antibodies to types I and II collagen by synovial tissue cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, v.32, n.9, p.1087-1092, Sept. 1989.

TAYLOR, P.C., CHU, C.Q., PLATER-ZYBERK, C., MAINI, R.N. Transfer of type II collagen-induced arthritis from DBA/1 to severe combined immunodeficiency mice can be prevented by blockade of Mac-1. *Immunology*, v.88, n.2, p.315-321, June 1996.

THORBECKE, G.J., SHAH, R., LEU, C.H., KURUVILLA, A.P., HARDISON, A.M., PALLADINO, M.A. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.89, n.16, p.7375-7379, Aug. 15, 1992.

TRENTHAM, D.E., TOWNES, A.S., KANG, A.H. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.*, v.146, n.3, p.857-868, 1977.

UHLIG, T., HAGEN, K.B., KVIEN, T.K. Current tobacco smoking, formal medication and the risk of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, v.26, n.1, p.47-54, Jan. 1999.

VAN DER HEIJDEN, I.M., WILBRINK, B., TCHETVERIKOV, I., SCHRIJVER, I.A., SCHOOLS, L.M., HAZENBERG, M.P., BREEDVELD, F.C., TAK, P.P. Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum.*, v.43, n.3, p.593-598, Mar. 2000.

VAN GISBERGEN, K.P., SANCHEZ-HERNANDEZ, M., GEIJTENBEEK, T.B., VAN KOOYK, Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.*, v.201, n.8, p.1281-1292, Apr. 18, 2005.

WAGNER, H. Phytomedicine Research in Germany. *Environ. Health Perspect.*, v.107, n.10, p.779-781, Oct. 1999.

WICKS, I.P., MOORE, J., FLEMING, A. Australian mortality statistics for rheumatoid arthritis 1950-81: analysis of death certificate data. *Ann. Rheum. Dis.*, v.47, n.7, p.563-569, July 1988.

WILKINSON, N.Z., KINGSLEY, G.H., JONES, H.W., SIEPER, J., BRAUN, J., WARD, M.E. The detection of DNA from a range of bacterial species in the joints of patients with a variety of arthritides using a nested, broadrange polymerase chain reaction. *Rheumatology (Oxford)*, v.38, n.3, p.260-266, Mar. 1999.

WILLIAMS, P.J., JONES, R.H., RADEMACHER, T.W. Correlation between IgG anti-type II collagen levels and arthritic severity in murine arthritis. *Autoimmunity*, v.27, n.4, p.201-207, 1998.

WILLIAMS, R.O., FELDMANN, M., MAINI, R.N. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.89, n.20, p.9784–9788, Oct. 15, 1992.

WOOLEY, P., SEIBOLD, J.R., WHALEN, J.D., CHAPDELAINE, J.M. Pristane-induced arthritis: The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. *Arthritis Rheum.*, v.32, n.8, p.1022–1030, Aug. 1989.

WOOLEY, P.H., LUTHRA, H.S., STUART, J.M., DAVID, C.S. Type II collagen induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I-region) linkage and antibody correlates. *J. Exp. Med.*, v.154, n.3, p.688-700, Sept. 1, 1981.

WOOLEY, P.H., CHAPEDELAINE, J.M. Immunogenetics of collagen-induced arthritis. *Crit. Rev. Immunol.*, v.8, n.1, p.1-22, 1987.

WOOLEY, P.H. Animal models of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v.3, n.3, p.407-420, Jun. 1991.

WOOLEY, P.H. Immunotherapy in Collagen-Induced Arthritis: Past, Present, and Future. *Am. J. Med. Sci.*, v.327, n.4, p.217-226, Apr. 2004.

WORDSWORTH, B.P., LANCHBURY, J.S., SAKKAS, L.I., WELSH, K.I., PANAYI, G.S., BELL, J.I. HLADR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.86, n.24, p.10049–10053, Dec. 1989.

YELIN, E., WANKE, L.A. An assessment of the annual and long-term direct costs of rheumatoid arthritis. The impact of poor function and functional decline. *Arthritis Rheum.*, v.42, n.6, p.1209-1218, June 1999.

YUNES, R.A., PEDROSA, R.C., CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim. Nova*, v.24, p.147-152, 2001.