

LUCIANA MIRANDOLA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**EFEITOS DOS EXTRATOS DA *Acanthospermum australe*
SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

Orientadora: *Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Luciana Mirandola.*

Campinas, 02 de março de 2001.


Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
- Orientadora -



LUCIANA MIRANDOLA

**EFEITOS DOS EXTRATOS DA *Acanthospermum australe*
SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



69427008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M672e Mirandola, Luciana
 Efeitos dos extratos da *Acanthospermum australe* sobre a resposta
 imunológica / Luciana Mirandola. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

 Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

 1. Plantas medicinais . 2. Camundongo - Imunologia. 3.
 Carcinoma de Ehrlich. 4. Hematopoese. I. Mary Luci de Souza
 Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

1. Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

2. Prof. Dr. Edson Antunes

3. Profa. Dra. Giselle Zenker Justo

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/03/2001

"Oh! Imensa é a graça poderosa que reside nas ervas e em suas raras qualidades, porque na terra não existe nada tão vil que não preste à terra algum benefício especial ... Dentro do termo cálice de débil flor residem o veneno e o poder medicinal..."

(Cena III, Ato II Romeu e Julieta - William Shakespeare, 1564-1616)

Aos meus avós pela sua sabedoria de vida

Aos meus pais que ensinaram o amor à vida

À minha irmã que compartilha dos mesmos ensinamentos.....

Em um lugar bem distante desta dimensão, paira-se uma alma de grande valor, a qual um dia já esteve presente neste espaço de tempo expandindo muito luz que sempre permanecerá em nossos corações.

(à Fátima Regina Pereira Rosa - in memorium)

Agradecimentos

"Não podemos esperar construir um mundo melhor sem melhorar o indivíduo. Com esse objetivo em mente, cada um de nós deve trabalhar em direção ao seu desenvolvimento máximo, ao mesmo tempo aceitando sua parte na responsabilidade com a vida geral da humanidade. Nosso dever particular é de ajudar aqueles aos quais sentimos que podemos ser mais úteis."

Marie Curie, 1924

À Professora Dra. Mary Luci Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, agradeço por incentivar meu desenvolvimento científico, por sua amizade, enfim, por fornecer a oportunidade de crescimento em todas as positivas dimensões da vida.

Ao Professor Dr. Carlos Antônio Boschero pela amizade e incentivo.

Aos amigos: Adriana, Ana Cláudia, Ana Paula, Cláudia, Cristina, Daniela, Giselle, Marcos, Marize, Raphael, Silvia, Sueli, Solange, Valdirene por estarem presentes em determinados momentos de meu trabalho e por participarem das várias etapas da minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Hemocentro da UNICAMP, pelo auxílio financeiro.

Aos profissionais do Departamento de Comunicação Social do Hemocentro: Sandrinha e Rosana.

Aos secretários da Farmacologia: Wanderlei e Eduardo, aos secretários da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas: Maria Cecília e Tereza, aos funcionários do Hemocentro e a todas as pessoas que participaram ativamente ou passivamente no decorrer deste trabalho.

Eterno agradecimento ao Ser Superior que nos conduz luz e sabedoria para assim caminharmos em prol da evolução.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Número de CFU-GM da medula óssea de camundongos normais e tratados com 3 doses dos diferentes extratos da <i>A. australe</i>	44
Figura 2. Número de CFU-GM da medula óssea de camundongos normais ou inoculados com TAE tratados com 3 doses dos diferentes extratos da <i>A. australe</i>	45
Figura 3. Número CFU-GM do baço de camundongos normais e tratados com 3 doses dos diferentes extratos da <i>A. australe</i>	46
Figura 4. Número de CFU-GM do baço de camundongos normais ou inoculados com TAE tratados com 3 doses dos diferentes extratos da <i>A. australe</i>	47
Figura 5. Curva de sobrevida dos grupos inoculados com TAE e TAE/tratado com as 3 doses do extrato hidroalcoólico.	49
Figura 6. Curva de sobrevida dos grupos inoculados com TAE e TAE/tratado com as 3 doses do extrato aquoso.....	49
Figura 7. Curva de sobrevida dos grupos inoculados com TAE e TAE/tratado com as 3 doses do extrato butanólico	50
Figura 8. Curva de sobrevida dos grupos inoculados com TAE e TAE/tratado com as 3 doses do extrato clorofórmico.....	50

Tabela 1. Titulação do meio condicionado de células esplênicas em presença de células.....	38
Tabela 2. Número de CFU-GM da medula óssea de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com o extrato hidroalcoólico da <i>A. australe</i>	71
Tabela 3. Número de CFU-GM do baço de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com o extrato hidroalcoólico da <i>A. australe</i>	71
Tabela 4. Número de CFU-GM da medula óssea de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com o extrato aquoso da <i>A. australe</i>	72
Tabela 5. Número de CFU-GM do baço de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com o extrato aquoso da <i>A. australe</i>	72
Tabela 6. Número de CFU-GM da medula óssea de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com o extrato butanólico da <i>A. australe</i>	73
Tabela 7. Número de CFU-GM do baço de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com o extrato butanólico da <i>A. australe</i>	73
Tabela 8. Número de CFU-GM da medula óssea de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com o extrato clorofórmico da <i>A. australe</i>	74
Tabela 9. Número de CFU-GM do baço de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com o extrato clorofórmico da <i>A. australe</i>	74
Tabela 10. Avaliação de sobrevivência de animais com o TAE e tratados com as 3 doses dos diferentes extratos da <i>A. australe</i>	75
Tabela 11. Peso do baço de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com 3 doses dos diferentes extratos da <i>A. australe</i>	76
Tabela 12. Celularidade da medula óssea de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com 3 doses dos diferentes extratos da <i>A. australe</i>	76
Tabela 13. Celularidade do baço de camundongos controle ou inoculados com o TAE e tratados com 3 doses dos diferentes extratos da <i>A. australe</i>	76

RESUMO	xxi
SUMMARY.....	xxiv
I- INTRODUÇÃO	25
II- OBJETIVO	30
III- MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
1. Animais	33
2. <i>Acanthospermum australe</i>	33
3. Obtenção do tumor	35
4. Tratamento	35
5. Procedimentos Experimentais	36
5.1- Cultura Clonal de precursores hematopoiéticos de medula óssea e do baço de camundongos	36
5.1.1-Técnica	36
5.2- Preparação do fator estimulador do crescimento de colônias.....	37
5.3- Peso do baço	38
6. Curva de Sobrevida.....	39
7. Análises Estatísticas.....	39
IV- RESULTADOS.....	40
1. Efeitos do tratamento com os extratos da <i>A. australe</i> na mielopoiese esplênica e medular de animais portadores do TAE	41
2. Efeitos do tratamento com os extratos da <i>A. australe</i> sobre a sobrevida de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich	48
3. Efeitos do tratamento com os extratos da <i>A. australe</i> sobre no peso do baço na celularidade de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich	51
V- DISCUSSÃO.....	52
VI- CONCLUSÃO	59
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
VIII- APÊNDICE	70

Neste trabalho, investigamos os efeitos antitumorais de diferentes doses dos extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *Acanthospermum australe* utilizando o modelo experimental de inoculação de células do tumor ascítico de Ehrlich. Os parâmetros avaliados consistiram do crescimento e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea e do baço para a série granulócito-macrófago (CFU-GM) e da sobrevivência dos animais portadores do tumor e tratados com os diferentes extratos da *A. australe*.

Para realização dos experimentos, inoculou-se o tumor na dose de 6×10^6 células/animal. Iniciou-se, 24 horas após a inoculação, o tratamento com os diferentes extratos da *A. australe*, que consistiu da administração oral (gavagem) de diferentes doses (100, 500 ou 1000mg/kg) por 3 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a administração da última dose do extrato hidroalcoólico da *A. australe* observamos, no animal normal, não portador de tumor, um aumento no número de CFU-GM da medula óssea com as três doses, enquanto que após, a administração do extrato butanólico observamos um aumento no número de CFU-GM na medula apenas com as duas menores doses ou seja, 100 e 500mg/kg, em relação ao grupo de animais controle. Por outro lado, a administração dos extratos aquoso e clorofórmico não produziu nenhum efeito no número de CFU-GM na medula. Nenhuma alteração foi observada com os diferentes extratos no número de CFU-GM do baço, em relação ao controle não tratado.

A inoculação do tumor nos animais produziu uma diminuição no número de CFU-GM na medula óssea e um aumento no número de CFU-GM no baço. Os animais inoculados com células tumorais e tratados com as 3 doses dos extratos da planta apresentaram uma proteção contra a mielossupressão. Essa proteção variou de acordo com o tipo de extrato e com a dose. No caso dos extratos hidroalcoólico e aquoso, as doses de 100 e 500mg/kg foram mais efetivas que a dose de

1000mg/kg no quanto ao aumento da mielopoiese. Além disso, a administração do extrato hidroalcoólico, na dose de 500mg/kg produziu um efeito mieloestimulador significativamente maior, quando comparados com as doses de 100 e 1000mg/kg. As 3 doses dos extratos butanólico e clorofórmico também induziram a mielopoiese. No entanto, os efeitos produzidos pelas doses de 100 e 1000mg/kg foram significativamente inferiores que ao observado para a dose de 500mg/kg. Quanto à hematopoiese esplênica, observamos que, com as 3 doses dos diferentes extratos, o número de CFU-GM reduziu significativamente em relação aos animais portadores de TAE, porém níveis normais não foram atingidos.

Nos animais inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich observamos um aumento no peso do baço, que foi revertido pelo tratamento com os diferentes extratos da planta nas doses de 100, 500 e 1000mg/kg.

O tratamento dos animais portadores do tumor com 500mg/kg dos extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da planta aumentou a sobrevida em 10%, 10%, 25% e 15%, respectivamente, diante da morte de 100% dos animais do grupo não tratado. As doses de 100 e 1000mg/kg dos quatros extratos não aumentaram a sobrevivência dos animais em relação aqueles não tratados.

Os resultados obtidos neste trabalho, de que os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* promovem proteção contra os efeitos causados pelo tumor sobre os precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço e são capazes de aumentar a sobrevida dos animais portadores do tumor, sugerem que a *A. australe* poderia proteger contra a mielossupressão provocada por agentes quimioterapêuticos usados na clínica, além de aumentar a resistência do hospedeiro.

In this work we have investigated the growth and differentiation of granulocyte/macrophage progenitor cells (CFU-GM) in the bone marrow and spleen of Ehrlich ascites tumour-bearing mice (EAT) treated with *Acanthospermum australe* extracts. Male BALB/c mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 6×10^6 viable tumor cells/mouse and 100, 500 or 1000mg/kg *A. australe* hidroalcoholic, aqueous, butanolic and chloroformic extracts were given orally, for 3 consecutive days. The bone marrow and spleen progenitor cells were collected 24 hours after the treatment and the growth and differentiation of colony-forming cells were studied by the clonal culture of hematopoietic cells in semi-solid medium.

The number of bone marrow CFU-GM in normal mice treated with the three doses of the hidroalcoholic extract, as well as 100 and 500mg/kg doses of the butanolic extract was significantly increased above normal levels. On the other hand, treatment of normal mice with the three doses of the aqueous and chloroformic extracts produced no changes in the number of CFU-GM in bone marrow, when compared to the controls. No statistical differences were observed among the effects of the three doses 100, 500 and 1000mg/kg of the different extracts of *A. australe* on the CFU-GM number in the spleen when compared with the control group.

In tumor-bearing mice, the total number of CFU-GM per femur was significantly reduced whereas in the spleen the number of these progenitors was dramatically increased. Treatment of these animals with the three doses of the four extracts reverted the medullar suppression and reduced the increased extramedullar hematopoiesis induced by the tumor. Although, the treatment with 100, 500 and 1000mg/kg of the four extracts reduced the number of CFU-GM in the spleen, these values have not returned to normal levels.

The administration of 100, 500 and 1000mg/kg of the hidroalcoholic and aqueous extracts caused a recovery in the number of bone marrow CFU-GM, compared to the control and tumor-bearing groups. In addition, statistical difference was observed among the 3 treatment schedules. In relation to the butanolic and chloroformic extracts, the 500mg/kg dose was the most effective to recover the medullar hematopoiesis

An increase in spleen weight of the tumor-inoculated animals was observed, reverted with the administration of 100, 500 and 1000mg/kg of the different extracts of *A. australe*.

The survival rate of the animals was evaluated for 30 days after inoculation of EAT. Whereas all the untreated tumor-bearing mice died within 20 days. Survival rates of 10%, 10%, 25% and 15%, were observed with the administration of 500mg/kg of the hidroalcoholic, aqueous, butanolic and chloroformic extracts, respectively. Treatment of these animals with the different extracts at the doses of 100 and 1000mg/kg produced no significant protective effects.

These results demonstrated that *Acanthospermum australe* extracts promote protection against the effects caused by the tumor on the hematopoietic response in the bone marrow and the spleen and increase survival of tumor-bearing mice at a dose of 500mg/kg of all the extracts.

I - Introdução

Trabalhos na literatura demonstram a atividade imunoprotetora em diversos modelos experimentais de inoculação tumoral induzida por substâncias químicas, tais como flavonóides, lactonas sesquiterpênicas e diterpênicas, extraídas de diversas plantas medicinais, os quais atribuem a esses compostos uma potente atividade neoplásica. (SALEH *et al.*, 1979; FUJI *et al.*, 1989; QUITERO *et al.*, 1999; SADZUKA *et al.*, 2000; SHIH *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2000).

A *Acanthospermum australe* O. Kuntze (Loefl), conhecida popularmente como carrapicho rasteiro, é uma planta da família Compositae que é usada tradicionalmente no tratamento de disfunções renais e tumores malignos (DI STASI, *et al.*, 1989; RÊGO, 1983; LORENZI, 1991). Estudos farmacológicos mostram uma redução de 40% na parasitemia em camundongos infectados e posteriormente tratados com o extrato aquoso da *Acanthospermum australe* (CARVALHO & KRETTLI, 1991; CARVALHO *et al.*, 1991). O extrato aquoso liofilizado dessa planta apresentou potente atividade antioxidante (DESMARCHELIER *et al.*, 1997).

Sesquiterpenos (HERZ & KALYANARAMAN, 1975; BOHLMANN *et al.*, 1981; BOHLMANN *et al.*, 1984; MATSUNAGA *et al.*, 1996), diterpenos (BOHLMANN *et al.*, 1981), flavonóides (SHIMIZU *et al.*, 1987; DEBENEDETTI *et al.*, 1987), monoterpenos e uma mistura de alcalóides (BOHLMANN *et al.*, 1984), foram isolados de diversas partes da *A. australe*. No óleo essencial das folhas, constatou-se a presença de 0,13% de terpenos. Os componentes majoritários foram isocarofileno 13,47%, gama-humuleno 13,90%, viridifloreno 25,35%, d-cadinena 5,5%, b-elemene 14,4%, g-cadinena 13,0% e germacrena A 10,1%. (MACHADO *et al.*, 1994; DE MARAIS *et al.*, 1998).

Alguns trabalhos demonstram os efeitos da *A. australe* sobre o sistema imunológico. Estudos *in vitro* demonstraram que os diterpenos presentes na *A. australe* produziram elevada estimulação das células T na ausência de mitógenos (RADUNZ *et al.*, 1991). Ensaio preliminares *in vitro* ainda avaliaram a ação antitumoral dessa planta (GONZÁLEZ *et al.*, 1992).

Estudos experimentais indicam que a presença de um novo componente isolado da *A. australe*, cuja estrutura foi determinada como sendo um sesquiterpeno e denominada de Acanthostrale, apresenta atividade antineoplásica contra a linhagem de células leucêmicas L1210 (MATSUNAGA *et al.*, 1996).

A utilização de modelos experimentais de inoculação tumoral são importantes como indicadores de atividade antitumoral de diferentes compostos. EHRLICH & APOLANT (1905) descreveram o aparecimento de um tumor espontâneo na região da glândula mamária de um camundongo fêmea conhecido atualmente por tumor de Ehrlich. O tumor de Ehrlich caracteriza-se por não regredir espontaneamente e ser facilmente mantido por transplantes sucessivos no tecido subcutâneo ou no peritônio de qualquer linhagem murina, desenvolvendo-se na forma sólida ou ascítica respectivamente (SIGIURA, 1965).

Estudos acerca dos mecanismos imunológicos envolvidos no crescimento do tumor têm explorado o papel das respostas humoral e celular durante a evolução desse tumor. A proteção pode ser induzida em camundongos por imunização prévia com células ascíticas inativas (DONALDSON & MITCHELL, 1959; McKEE *et al.*, 1959; LITTMAN *et al.*, 1968; SETHI & BRANDIS, 1974). Alguns autores observaram que os mecanismos envolvidos na inibição do crescimento tumoral não estão direcionados contra os antígenos do complexo de histocompatibilidade principal nas células tumorais (CHEN & WATKINS, 1970), desta forma havendo uma estreita relação entre a produção de IgM em camundongos imunizados contra o tumor de Ehrlich e a resistência a subseqüentes transplantes tumorais. Resultados posteriores sugeriram que anticorpos capazes de reconhecer carboidratos na superfície das células tumorais atuariam no processo de supressão tumoral *in vivo* por um mecanismo macrófago-dependente (SUBIZA *et al.*, 1987; GIL *et al.*, 1990).

A influência do crescimento tumoral na proliferação das células pluripotentes (CFU-S) e das células progenitoras (CFU-C) da medula óssea tem sido sugerida por inúmeras observações. Está bem estabelecido na literatura que o tumor de Ehrlich produz alterações severas no sistema hematolinfopoiético do hospedeiro, sendo frequentemente associado com imunodepressão, trombocitopenia, anemia, esplenomegalia, hematopoiese extramedular e leucocitose granulócito-dependente (DELMONTE *et al.*, 1966; CLERICI *et al.*, 1971; LALA *et al.*, 1977; KEEB & LALA, 1978; PESSINA *et al.*^{a,b}, 1982; PARHAR & LALA, 1988; SUBIZA *et al.*, 1989; BALDUCCI & HARDY, 1992; RUIZ DE MORALES *et al.*, 1999). O desenvolvimento do tumor leva, também, a perturbações nas células progenitoras comprometidas com a série granulócito-macrófago, os quais resultariam da elaboração de fatores solúveis pelas células tumorais ou em decorrência da interação entre células imunocompetentes-célula tumoral. (PELUS *et al.*, 1979; BURGUESS & METCALF, 1980; PESSINA *et al.*, 1982^{a,b}; KOBARI *et al.*, 1990; BONTA-BEN-EFRAIM, 1993). Utilizando a técnica de cultura clonal de células precursoras mielóides em meio semi-sólido, KEEB & LALA (1978) sugeriram uma redistribuição das células da medula óssea comprometidas com o desenvolvimento de colônias de granulócitos-macrófagos associada a esse fenômeno.

Resultados recentes, obtidos em nosso laboratório, utilizando o tumor ascítico de Ehrlich como modelo experimental, demonstraram um efeito imunoprotetor sobre os precursores da medula óssea de camundongos BALB/c para o composto diciclopentadienildiclorotitânio I (VALADARES *et al.*, 1998), para o MAPA (agregado de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio proteico) (JUSTO *et al.*, 2000), para a alga *Chlorella vulgaris* (JUSTO *et al.*, 2001), e para os extratos da *Caesalpinia ferrea* e da *Pluchea quitoc* (QUEIROZ *et al.*, 2001).

A intensidade da reação inflamatória provocada pelas células tumorais é de fundamental importância na evolução do crescimento tumoral. Vários estudos analisaram a relação entre as

células do influxo inflamatório e o crescimento tumoral. (EVANS & ALEXANDER, 1970; RUSSEL *et al.*, 1976; TALMADGE *et al.*, 1981; GUERRA, 1983; NARA *et al.*, 1986; MANTOVANI *et al.*, 1992; BARTH & MORAHAN, 1994). Esses eventos são importantes ao se considerar que o crescimento do tumor de Ehrlich altera padrões de migração celular, além de provocar uma reduzida reação inflamatória local. (FECCHIO *et al.*, 1990).

Diante do exposto, neste trabalho avaliamos os efeitos dos extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* sobre o número de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos na medula óssea e no baço, no modelo experimental de inoculação do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos. Considerando que células maduras do sistema imunológico são originárias das células pluripotenciais da medula óssea, as chamadas formadoras de colônias (CFU-C), investigamos o crescimento e diferenciação dessas células *in vitro*, empregando a técnica para cultura de células precursoras da medula óssea e do baço em meio semi-sólido. Para tanto, utilizamos um fator estimulador de colônias (CSF), produzido a partir de células de baço de camundongos (meio condicionado de células do baço - SCM), que regula o crescimento e a diferenciação das células precursoras hematopoiéticas. (METCALF, 1984; QUEIROZ, 1988).

II - Objetivos

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- estudar o efeito imunomodulador dos extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *Acanthospermum australe* em camundongos BALB/c portadores do tumor ascítico de Ehrlich, pela avaliação do número de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos na medula óssea e no baço (CFU-GM).
- avaliar a sobrevida de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados com os diferentes extratos da *A. australe*

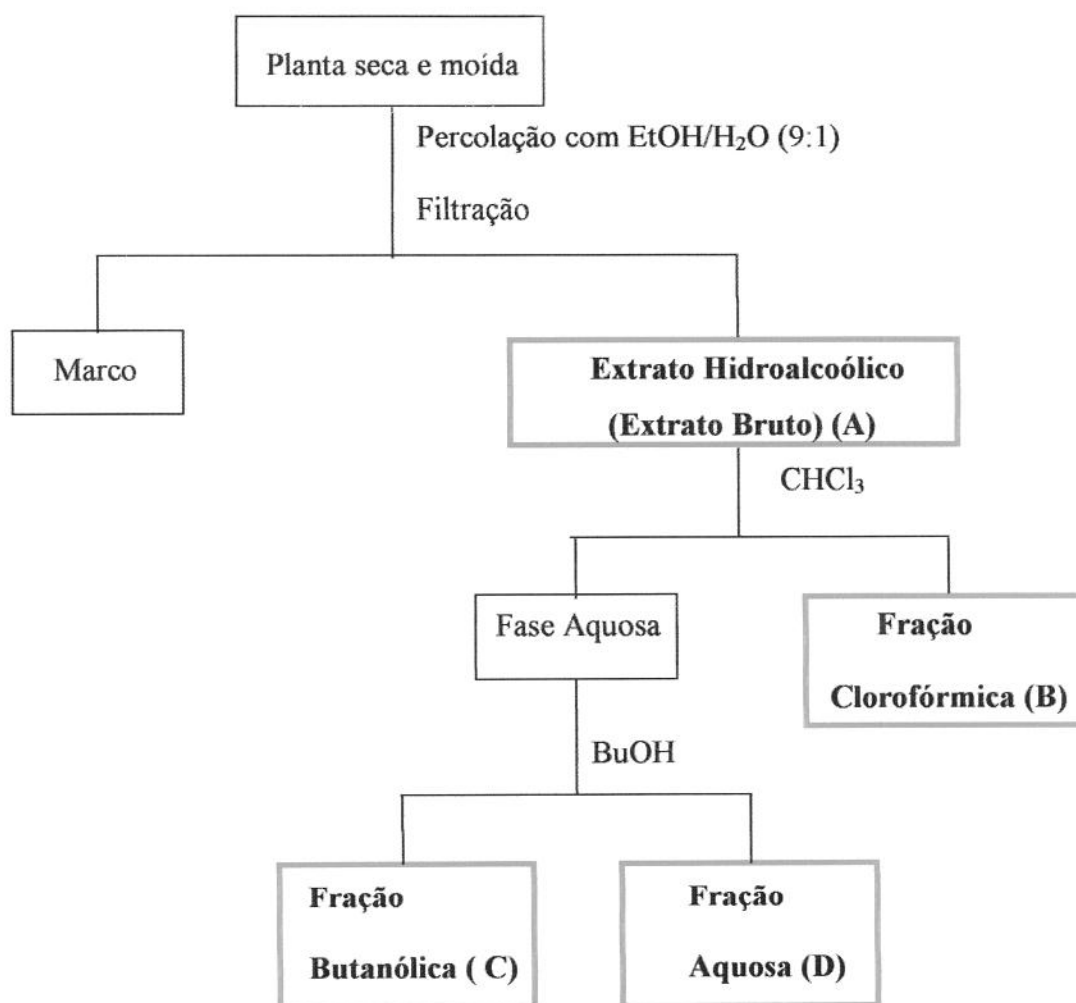
III – Material e Métodos

1- Animais

Tanto para a realização dos experimentos como para a manutenção das células tumorais de Ehrlich foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, com idade entre 6 e 8 semanas, os quais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP.

2- *Acanthospermum australe*

As partes aéreas e raízes da espécie *Acanthospermum australe* O. Kuntze (Loefl) (Compositae) foram secas ao sol e trituradas. O pó resultante passou por processo de extração por percolação em uma solução de etanol/água (9:1). A seguir, a mistura foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida a 45°C (em rotaevaporador) originando o extrato bruto hidroalcoólico (A) (esquema 1). Posteriormente, os extratos clorofórmico (B), butanólico (C) e aquoso (D) foram preparados pela extração seletiva com solventes de diferentes polaridades como descrito a seguir. Inicialmente, obteve-se o extrato clorofórmico pela adição do solvente clorofórmio ao extrato bruto. A seguir, os extratos butanólico e aquoso foram preparados adicionando-se butanol à fase aquosa residual.



Esquema 1: Elaboração dos extratos da *Acanthospermum australe* O.K.

3- Obtenção do Tumor Ascítico de Ehrlich

As células tumorais, originalmente obtidas de uma linhagem do Hospital do Câncer de São Paulo, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Szulim Zyngier do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). A linhagem tumoral de Ehrlich é mantida por passagens sucessivas intraperitoneais entre camundongos BALB/c machos.

As células tumorais de Ehrlich crescem como células ascíticas na cavidade peritoneal de camundongos e sua manutenção é feita por passagens consecutivas. Para o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich, camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 0,1mL de uma suspensão de células tumorais contendo 6×10^7 células/mL, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos doadores (6×10^6 células/animal).

Após a retirada do líquido ascítico do peritônio de camundongos doadores, o número e a viabilidade das células foram determinados pelo método de exclusão do corante azul de tripan, em câmara de Neubauer.

4- Tratamento

A administração dos extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *Acanthospermum australe* foi realizada por via oral, com auxílio de uma sonda, após diluição em água estéril, nas dosagens diárias de 100, 500 ou 1000 mg/kg num volume total de 0,2 mL dos extratos, por 3 dias consecutivos. Os grupos não tratados com a planta receberam somente água estéril por via oral. Em outros 2 grupos de animais, foram administrados intraperitonealmente 0,1mL de uma suspensão de células tumorais contendo 6×10^7 células/mL e 24 horas após a

inoculação, foram tratados com 3 doses dos diferentes extratos da planta nas dosagens de 100, 500 ou 1000 mg/kg. Um grupo recebeu apenas as células tumorais.

5- Procedimentos Experimentais

5.1- Cultura Clonal de Precursores Hematopoiéticos da Medula Óssea e do Baço de Camundongos

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células pluripotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que as condições da cultura sejam ajustadas para se evitar superposição das colônias na placa de Petri e permitir a identificação de cada colônia. Também, é importante que o fator estimulador de colônias (CSF) seja utilizado em concentrações supramáximas. Estamos utilizando como CSF o sobrenadante de células de baço de camundongos BALB/c estimuladas com o mitógeno "pokeweed" em cultura (SCM - meio condicionado de células esplênicas). Além disso, a escolha do soro bovino fetal deve ser realizada cuidadosamente, devido às variações de atividade entre os vários lotes e marcas de soro (METCALF, 1984).

5.1.1- Técnica

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e limpou-se a pele com álcool iodado. O fêmur foi exposto, removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior. Transferiu-se a medula óssea com o auxílio de agulha e seringa para um tubo de ensaio estéril contendo 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, USA). O baço foi removido assepticamente e colocado em tubo de ensaio estéril

contendo 5 mL de meio RPMI. As células foram liberadas cuidadosamente utilizando-se um macerador.

Contou-se o número de células nas suspensões em câmara hematocitométrica após diluição em solução de azul de tripan 0,2%.

Preparou-se o meio mais ágar (Bacto-ágar, Difco), o qual consiste de:

- 30% de meio DMEM (Sigma) 2x concentrado
- 20% de soro bovino fetal
- 50% de ágar (0,3% conc. final).

A seguir, adicionou-se o volume apropriado de suspensão celular, correspondendo a 1×10^5 células/mL e 2×10^5 células/mL para a avaliação da mielopoiese medular e periférica respectivamente, quando o meio mais ágar estava a 37°C. Ressuspendeu-se e distribuiu-se a cultura em volumes de 2 mL por placa de Petri (35mm), a qual já continha 0,1mL do estímulo apropriado (item 5.2). Distribuiu-se o conteúdo por toda a superfície da placa de Petri e deixou-se geleificar. Incubou-se por 7 dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ no ar. A seguir, contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecação com aumento de 40x (METCALF, 1984).

5.2- Preparação do fator estimulador de colônias (CSF). Meio condicionado de células esplênicas (SCM)

Baços de camundongos BALB/c foram removidos em condições assépticas e passados em peneira de aço inoxidável estéril. Preparou-se uma suspensão contendo 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, USA) contendo 10% de soro fetal bovino inativado (30

minutos a 56°C). Adicionou-se ao meio 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (concentração final) e 0,05 mL de “pokeweed mitogen” por mL de meio. Incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar. Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em membrana de 0,22µm (Millipore™)

A atividade funcional do CSF foi determinada pelo estímulo produzido sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas em meio semi-sólido. A titulação desse lote de SCM demonstrou não haver necessidade de posterior diluição com base nos resultados obtidos na cultura de sete dias (Tabela 1).

Tabela 1. Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células da medula óssea de camundongos BALB/c[#].

Diluição SCM	CFU-C*
1:1	102 ± 11
1:2	97 ± 3
1:4	55 ± 15
1:8	13 ± 4
1:16	15 ± 1
1:32	3 ± 1

[#]Número de células da medula óssea utilizado = 1×10^5 /mL

* Resultados obtidos em triplicata por diluição

± Desvio Padrão

5.3- Peso do baço

Após remoção do baço (como descrito no item 5.1.1), seu peso foi mensurado em mg para posterior análise.

6- Curva de Sobrevida

A fim de observar uma possível proteção dos animais tratados com os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *Acanthospermum australe* realizou-se a curva de sobrevida. Considerou-se para cada extrato dois grupos experimentais: animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e animais inoculados com TAE e tratados com os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico nas doses de 100, 500 ou 1000mg/kg, por 3 dias consecutivos.

7- Análises Estatísticas

Para avaliação da variável CFU-GM utilizou-se Análise de Variância (ANOVA). Detectadas diferenças estatísticas entre os grupos, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer para verificar as diferenças mínimas existentes entre todos os grupos.

Utilizou-se a Curva de Sobrevida de Kaplan-Meier e o teste de Log-Rank para análise da probabilidade de sobrevida.

Para todos os grupos considerou-se significância estatística para valores de $p < 0,05$.

IV – Resultados

1. Efeitos do tratamento com os extratos da *Acanthospermum australe* na mielopoiese esplênica e medular de animais portadores do TAE.

1.1. Extrato Hidroalcoólico

Os efeitos da administração do extrato hidroalcoólico da *A. australe* sobre o crescimento e a diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço (CFU-GM) estão apresentados nas Figuras 1 a 4 e nas Tabelas 2 e 3 (apêndice). Em animais normais, o extrato produziu, nas três doses utilizadas, um aumento significativo ($p < 0,001$) no número de colônias da medula óssea (Fig. 1). Nenhuma das 3 doses produziu alterações no número de CFU-GM do baço em relação ao grupo não tratado (Fig. 3).

Em animais portadores do tumor observamos uma redução no número de CFU-GM da medula óssea ($p < 0,001$) e um aumento no número de CFU-GM do baço ($p < 0,001$) (Fig. 2 e 4 respectivamente). O tratamento desses animais com o extrato hidroalcoólico da planta nas doses de 100, 500 e 1000mg/kg reverteu a mielossupressão. Efeitos mais significativos ($p < 0,001$) sobre o número de CFU-GM na medula foram observados com as 2 menores doses, ou seja, 100 e 500mg/kg. Além disso, a dose de 500mg/kg produziu um efeito mieloestimulador significativamente maior ($p < 0,001$) quando comparado com as doses de 100 e 1000mg/kg (Fig. 2). Com relação à hematopoiese esplênica observamos uma redução acentuada no número de CFU-GM ($p < 0,001$) que, no entanto, não atingiu os níveis do grupo controle (Fig. 4).

1.2. Extrato Aquoso

Os efeitos da administração do extrato aquoso da *A. australe* sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço (CFU-GM) estão

apresentados nas Figuras 1 a 4 e nas Tabelas 4 e 5 (apêndice). Em animais normais, não portadores do TAE, o extrato não produziu alterações no número de precursores de granulócitos/macrófagos na medula (Fig. 1). Nenhuma das 3 doses produziu alterações no número de CFU-GM no baço em relação ao grupo de animais controle (Fig. 3).

O padrão de resposta observado com o extrato aquoso nos animais portadores do TAE foi semelhante ao produzido pelo extrato hidroalcoólico, ou seja, o tratamento desses animais com as três doses do extrato aquoso produziu uma reversão significativa ($p < 0,001$) na mielossupressão induzida pelo tumor. Efeitos mais significativos ($p < 0,001$) sobre o número de CFU-GM na medula foram observados com as 2 menores doses, ou seja, 100 e 500mg/kg (Fig. 2). Com relação à hematopoiese extramedular, observamos uma redução significativa ($p < 0,001$) no número de CFU-GM que, no entanto, não atingiu os valores normais do grupo controle (Fig. 4).

1.3. Extrato Butanólico

Os efeitos da administração do extrato butanólico da *A. australe* sobre o crescimento e a diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço (CFU-GM) estão apresentados nas Figuras 1 a 4 e nas Tabelas 6 e 7 (apêndice). A administração do extrato butanólico em animais normais levou a um aumento significativo no número de CFU-GM na medula óssea ($p < 0,001$) apenas nas doses 100 e 500mg/kg (Fig. 1). Nenhuma das 3 doses produziu alterações no número de CFU-GM no baço, em relação ao grupo controle (Fig. 3).

Conforme mencionado anteriormente, a presença do tumor produziu uma redução estatisticamente significativa no número de CFU-GM da medula ($p < 0,001$) e um aumento no número de CFU-GM do baço ($p < 0,001$) (Fig. 2 e 4 respectivamente). O tratamento com 100, 500 e 1000mg/kg do extrato butanólico produziu uma resposta hematopoiética medular e

extramedular semelhante à observada com os 2 extratos anteriores. Com relação as diferentes doses utilizadas, a dose de 500mg/kg produziu um efeito mais acentuado sobre a mielopoiese ($p<0,05$). (Fig. 2).

O tratamento com as 3 doses do extrato produziu uma redução significativa no número de CFU-GM no baço ($p<0,001$) em relação aos animais portadores do TAE. Essa redução não atingiu níveis normais e os valores permaneceram significativamente aumentados ($p<0,001$) em relação ao grupo controle (Fig. 4).

1.4. Extrato Clorofórmico

Os efeitos da administração do extrato clorofórmico da *A. australe* sobre o crescimento e a diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço (CFU-GM) estão apresentados nas Figuras 1 a 4 e nas Tabelas 8 e 9 (apêndice). Ao contrário do observado com os extratos hidroalcoólico e butanólico, em animais normais, o extrato clorofórmico, assim como o aquoso, não produziu alterações no número de CFU-GM da medula óssea (Fig. 1). Nenhuma das 3 doses provocou alterações no número de CFU-GM do baço em relação ao grupo de animais controle (Fig. 3).

Nos animais portadores do TAE, observamos o mesmo padrão de resposta hematopoiética do extrato butanólico, ou seja, o tratamento desses animais com as três doses do extrato clorofórmico produziu uma reversão significativa ($p<0,001$) na mielosupressão induzida pelo tumor. Efeitos mais significativos sobre o número de CFU-GM na medula foram observados com a dose de 500mg/Kg ($p<0,001$). Com relação à hematopoiese esplênica, observamos uma redução significativa ($p<0,001$) no número de CFU-GM que, no entanto, não atingiu os valores normais do grupo controle.

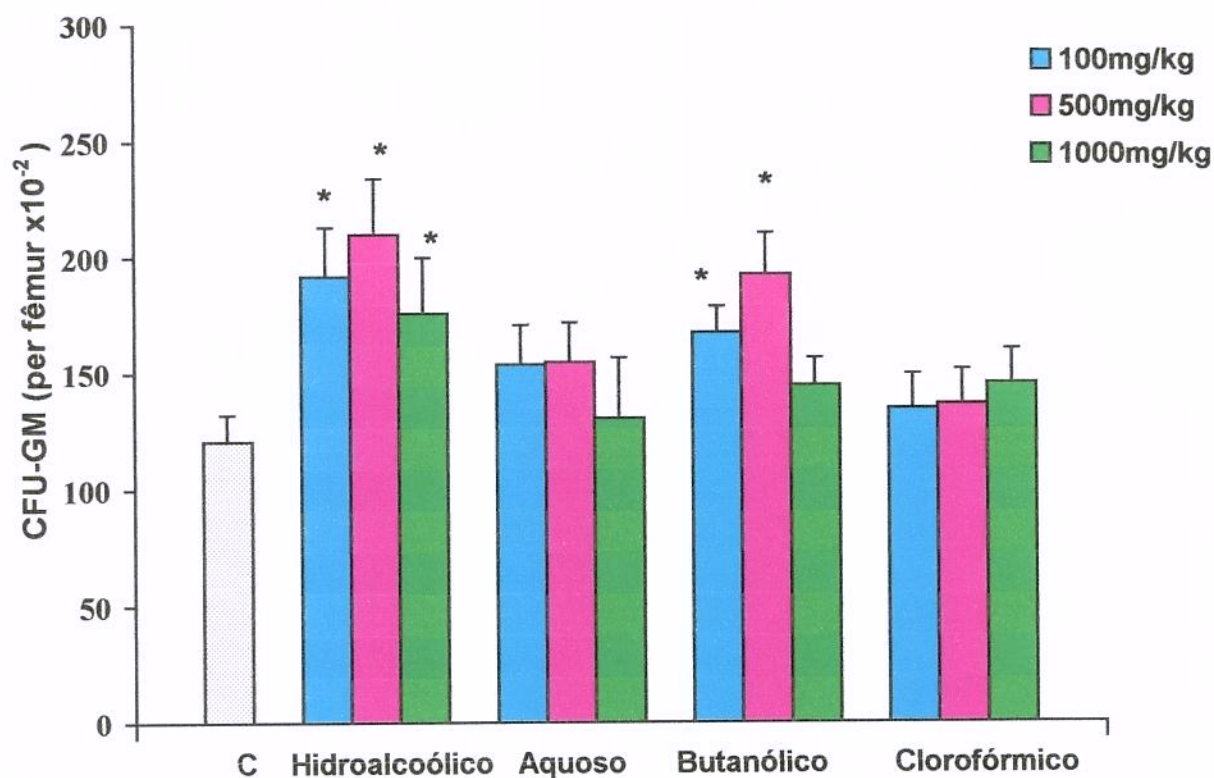


Figura 1. Número de células formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos da medula óssea de camundongos BALB/c normais (C) e tratados com 3 doses consecutivas dos extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* (100, 500 ou 1000mg/kg). O número de CFU-GM foi determinado 24 horas após o término do tratamento. Os valores expressam a média e o desvio padrão de 8 animais/grupo.

ANOVA-Tukey; $p < 0,001$: * em relação ao C.

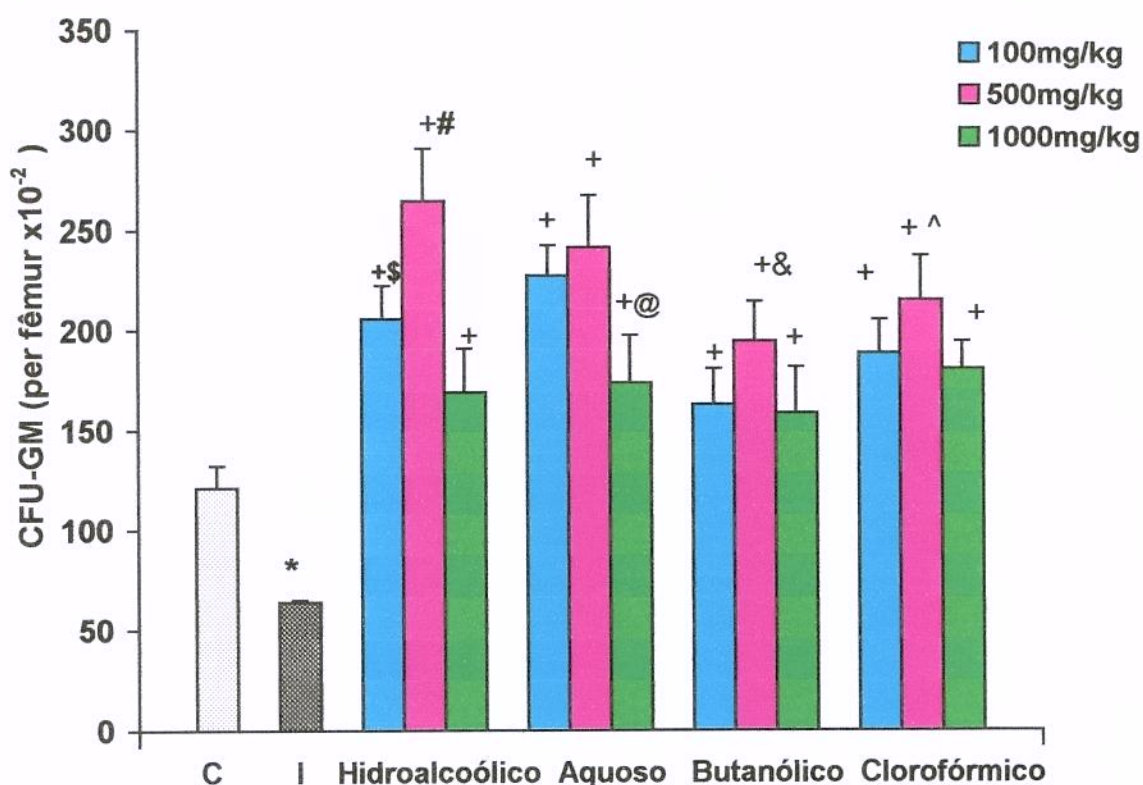


Figura 2. Número de células formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos da medula óssea de camundongos BALB/c normais (C) ou inoculados com TAE (I) (6×10^6 células/animal) tratados com 3 doses consecutivas dos extratos hidroalcoólico (H), aquoso (A), butanólico (B) e clorofórmico (Cl) da *A. australe* (100, 500 ou 1000mg/kg). O tratamento com os extratos da planta iniciou-se 24 horas após a inoculação do tumor. O número de CFU-GM foi determinado 24 horas após o término do tratamento. Os valores expressam a média e o desvio padrão de 8 animais/grupo. ANOVA-Tukey; $p < 0,001$: * em relação ao C, + em relação ao I e ao C, # em relação ao (H) I+100mg/kg e ao I+1000mg/kg, @ em relação ao (A) I+100mg/kg e ao (A) I+500mg/kg; $p < 0,01$: \$ em relação ao (H) I +1000mg/kg; $p < 0,05$: & em relação ao (B) I+100mg/kg e ao (B) I+1000mg/kg, ^ em relação ao em relação ao (Cl) I+100mg/kg e ao (Cl) I+1000mg/kg.

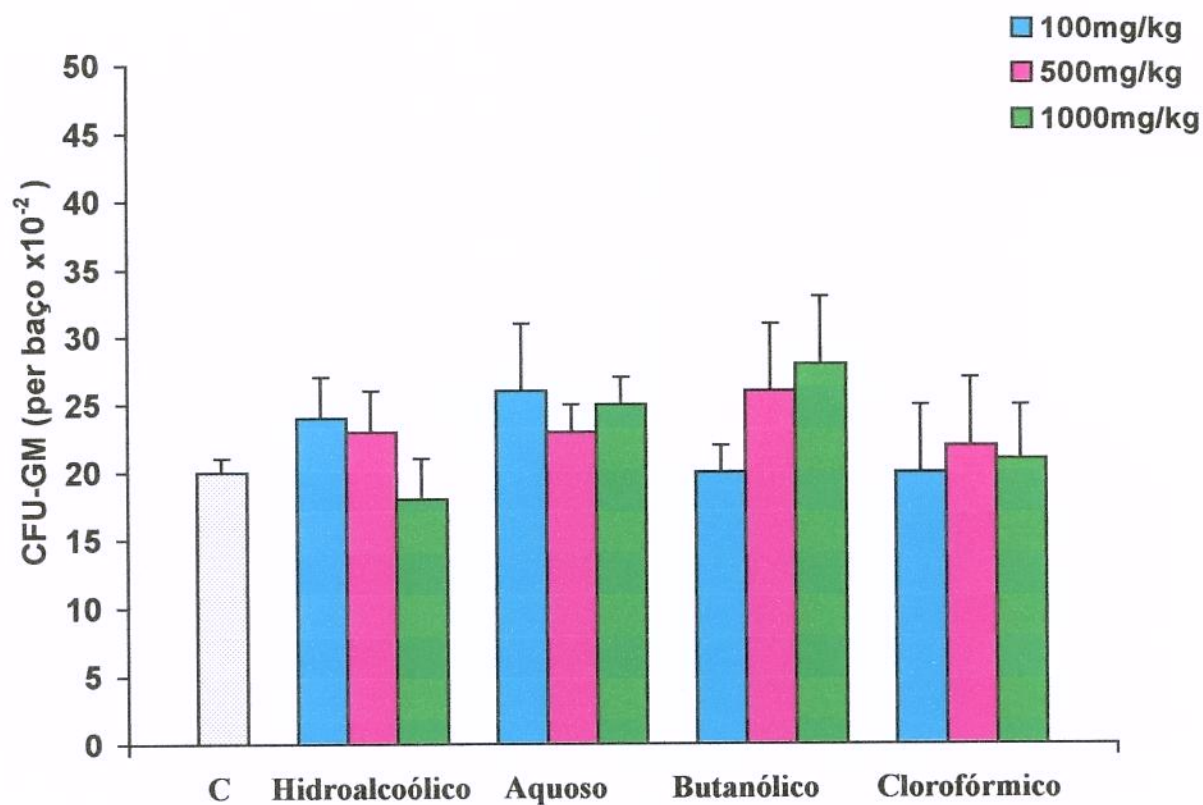


Figura 3. Número de células formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos do baço de camundongos BALB/c normais (C) e tratados com 3 doses consecutivas dos extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* (100, 500 ou 1000mg/kg). O número de CFU-GM foi determinado 24 horas após o término do tratamento. Os valores expressam a média e o desvio padrão de 8 animais/grupo.

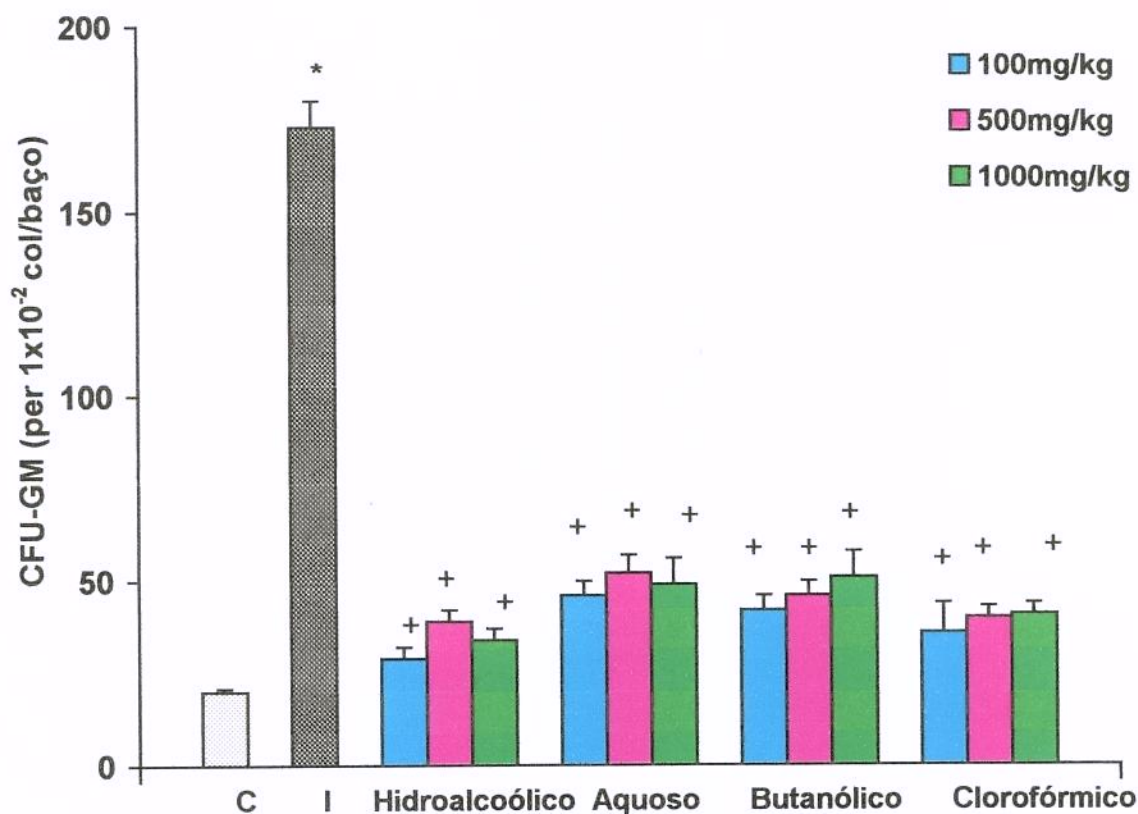


Figura 4 . Número de células formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos do baço de camundongos BALB/c normais (C) ou inoculados com TAE (I) (6×10^6 células/animal) tratados com 3 doses consecutivas dos extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* (100, 500 ou 1000mg/kg). O tratamento com os extratos da planta iniciou-se 24 horas após a inoculação do tumor. O número de CFU-GM foi determinado 24 horas após o término do tratamento. Os valores expressam a média e o desvio padrão de 8 animais/grupo.

ANOVA-Tukey; $p < 0,001$: * em relação ao C, + em relação ao I e ao C.

2. Efeitos do tratamento com os extratos da *Acanthospermum australe* sobre a sobrevida de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

A sobrevida dos animais portadores do TAE (6×10^6 células/animal) tratados com os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* nas doses de 100, 500 e 1000mg/kg, encontra-se nas Figuras 5 a 9 e na Tabela 10 (apêndice).

Os animais foram avaliados durante 30 dias após a inoculação do tumor. A mortalidade do grupo controle foi de 100%, sendo que as 3 primeiras mortes ocorreram no 14º dia e as demais, gradativamente até o 20º dia após a inoculação do tumor. Nessa avaliação, observamos uma maior sobrevida nos animais tratados com os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico na dose de 500mg/kg em relação ao grupo não tratado, correspondendo a 10%, 10%, 25% e 15% respectivamente.

Com relação aos grupos tratados com as doses de 100 e 1000 mg/kg dos quatros extratos da planta não observamos aumento significativo da sobrevida em relação ao grupo de animais inoculados sem tratamento.

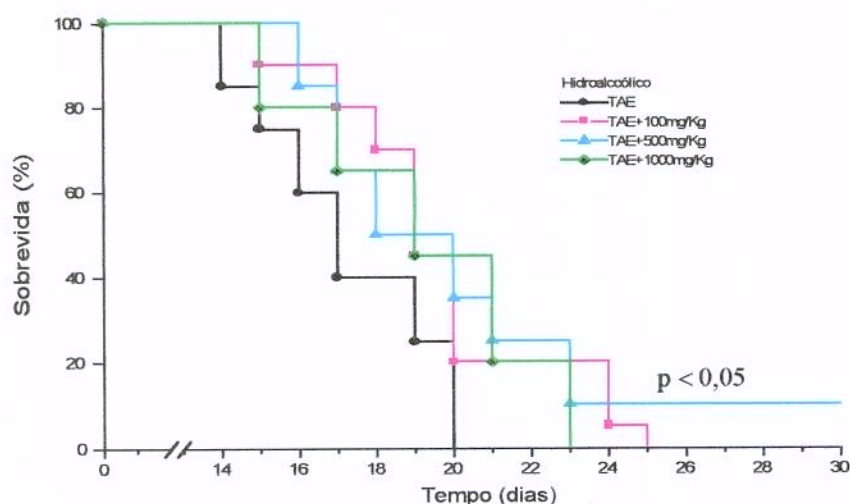


Figura 5. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos grupos inoculados com TAE e TAE/tratado com 100, 500 ou 1000mg/kg por 3 dias consecutivos com extrato hidroalcoólico. Após inoculação com TAE (6×10^6 mL/animal), a mortalidade dos animais foi avaliada por um período de 30 dias. Test - Log-rank; $p < 0,05$ em relação ao TAE.

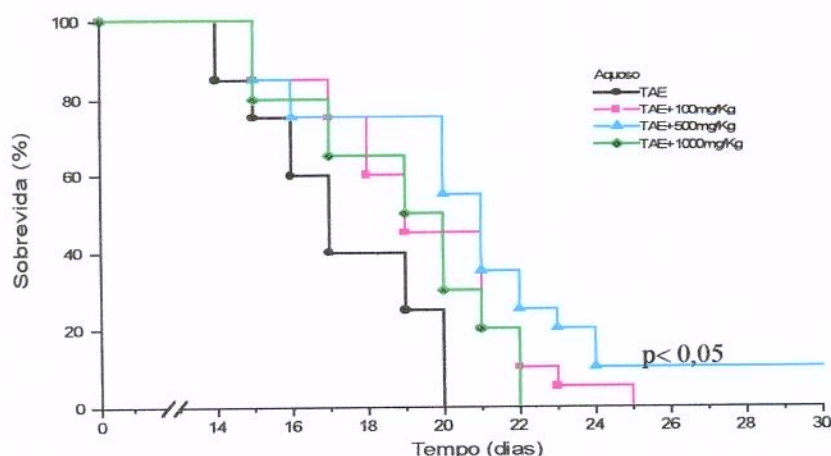


Figura 6. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos grupos inoculados com TAE e TAE/tratado com 100, 500 ou 1000mg/kg por 3 dias consecutivos com extrato aquoso. Após inoculação com TAE (6×10^6 mL/animal), a mortalidade dos animais foi avaliada por um período de 30 dias. Test - Log-rank; $p < 0,05$ em relação ao TAE.

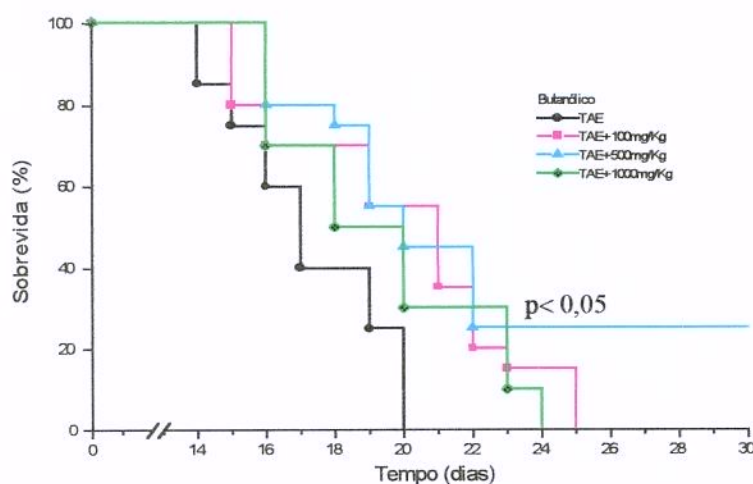


Figura 7. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos grupos inoculados com TAE e TAE/tratado com 100, 500 ou 1000mg/kg por 3 dias consecutivos com extrato butanólico. Após inoculação com TAE (6×10^6 mL/animal), a mortalidade dos animais foi avaliada por um período de 30 dias. Test - Log-rank; $p < 0,05$ em relação ao TAE.

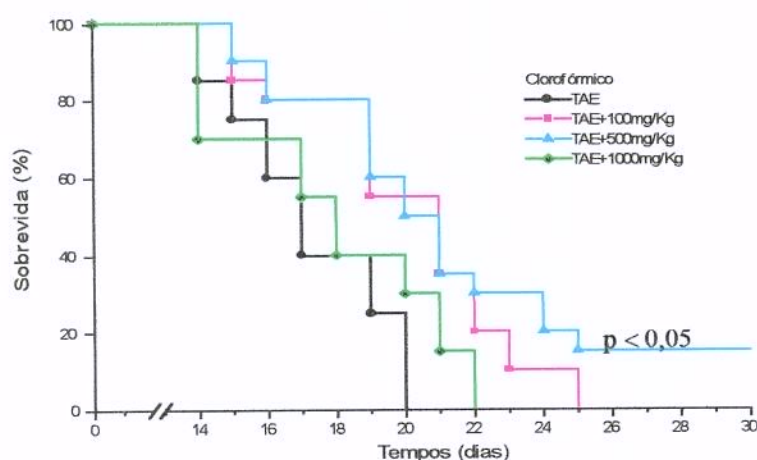


Figura 8. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos grupos inoculados com TAE e TAE/tratado com 100, 500 ou 1000mg/kg por 3 dias consecutivos com extrato clorofórmico. Após inoculação com TAE (6×10^6 mL/animal), a mortalidade dos animais foi avaliada por um período de 30 dias. Test - Log-rank; $p < 0,05$ em relação ao TAE.

3. Efeitos do tratamento com os extratos da *Acanthospermum australe* sobre o peso e a celularidade do baço de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

O peso e a celularidade do baço dos animais portadores do TAE (6×10^6 células/animal) tratados com os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* nas doses de 100, 500 e 1000mg/kg, encontra-se nas Tabelas 11 e 13, respectivamente (apêndice).

Nos grupos de animais normais tratados com as três doses dos diferentes extratos não observamos nenhuma alteração no peso e na celularidade dos baços em relação ao grupo de animais controle sem tratamento. Em animais portadores do tumor, observamos um aumento significativo no peso ($p < 0,001$) e na celularidade ($p < 0,05$) do baço. Porém, o tratamento destes animais com os diferentes extratos da planta nas doses de 100, 500 e 1000mg/kg produziu uma reversão nestes parâmetros ($p < 0,05$).

V – Discussão

Poucos são os estudos que demonstram as ações da *Acanthospermum australe* no sistema imunológico. Trabalhos *in vitro* demonstraram que diterpenóides sintetizados a partir de precursores isolados dessa planta estimulam linfócitos T na ausência de agentes mitogênicos (RADUNZ *et al.*, 1991). Estudos de citotoxicidade com um sesquiterpeno isolado da planta em cultura de células leucêmicas L1210 sugeriram atividade antitumoral (MATSUNAGA *et al.*, 1996). No entanto, nenhum estudo *in vivo* foi realizado com relação aos efeitos dessa planta sobre a resposta imunológica. Neste sentido, este trabalho relata resultados importantes obtidos para os efeitos dos extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* sobre a resposta imunológica de animais inoculados com tumor ascítico de Ehrlich.

O sistema hematopoiético é composto basicamente por três populações de células: as pluripotenciais, constituídas de grande capacidade de auto-renovação e diferenciação, as progenitoras, comprometidas com uma determinada linhagem e as em maturação. As duas últimas podem ser consideradas como populações em trânsito, em constante multiplicação e diferenciação e são originárias das células pluripotenciais. Estas por sua vez, representam uma minoria no total das populações hematopoiéticas (QUEIROZ, 1988). Utilizamos, em nossas investigações, a técnica de cultura clonal de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos para avaliar a resposta hematopoiética da medula óssea e do baço de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe*.

Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstram que o tumor ascítico de Ehrlich produz uma redução no número de CFU-GM na medula óssea e aumento nas células progenitoras esplênicas. (VALADARES *et al.*, 1998; JUSTO, *et al.*, 2000; JUSTO, *et al.*, 2001; QUEIROZ, *et al.*, 2001^{a, b}).

Nossos resultados confirmaram esta redução no número de células formadoras de colônias do tipo granulócito-macrófago para medula de camundongos inoculados com o TAE. Esta mielossupressão foi revertida com o tratamento com os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* nas doses de 100, 500 e 1000mg/kg por 3 dias consecutivos, sendo que efeitos mais acentuados foram observados com as duas menores doses, ou seja, 100 e 500mg/kg dos extratos hidroalcoólico e aquoso. Com relação aos extratos butanólico e clorofórmico, a resposta mais efetiva sobre o número de CFU-GM da medula óssea foi observada com a dose de 500mg/kg. Ademais, a administração das 3 doses do extrato hidroalcoólico e das doses de 100 e 500mg/kg do extrato butanólico aos camundongos normais proporcionou uma estimulação da mielopoiese, em relação aos animais não tratados. Ao contrário do observado com os dois extratos anteriores, os extratos aquoso e clorofórmico produziram efeitos semelhantes aos do grupo controle quando administrados aos animais normais.

A avaliação da hematopoiese periférica dos animais portadores do tumor demonstrou um aumento significativo no número de CFU-GM quando comparado ao grupo controle. Os animais inoculados com o TAE e tratados com as três doses dos diferentes extratos da *A. australe* por 3 dias consecutivos, apresentaram uma diminuição na atividade hematopoiética esplênica, que encontrava-se aumentada pela presença do tumor. Porém, esta redução no número de CFU-GM no baço não foi revertida aos níveis do normais. Nenhum efeito foi observado no baço dos animais normais tratados com os diferentes extratos.

Estes resultados são coerentes com relatos da literatura que apontam para o envolvimento de fatores solúveis, produzidos pelas células tumorais ou pela interação entre o hospedeiro e o tumor transplantado, em redirecionar a atividade dos macrófagos que estão envolvidos no processo do crescimento tumoral. (CLERICI *et al.*, 1971; RHODES, 1980; PESSINA *et al.*,

1982^b; HARDY & BALDUCCI, 1985; FECCHIO *et al.*, 1990; BONTA & BEN-EFRAIM, 1993; MURAI *et al.*, 1995; SEGURA *et al.*, 1997; ELGERT *et al.*, 1998; RUIZ DE MORALES *et al.*, 1999).

Um aspecto importante da agressividade do tumor é a influência de fatores derivados das células tumorais que estimulam a proliferação de macrófagos com atividade supressora (KEEB & LALA, 1972; PESSINA *et al.*, 1982^b; HARDY & BALDUCCI, 1985; SUBIZA *et al.*, 1989; BONTA & BEN-EFRAIM, 1993; YAMAMOTO *et al.*, 1995). Foi demonstrado que as células tumorais de Ehrlich produzem fatores capazes de induzir a proliferação de células esplênicas com alterações fenotípicas e funcionais (TOMIDA *et al.*, 1984; RUIZ DE MORALES *et al.*, 1999). SUBIZA *et al.* (1989) caracterizaram um aumento do baço com metaplasia mielóide em animais portadores do tumor de Ehrlich. Além disso, a presença de uma aumentada população de macrófagos supressores no baço de camundongos portadores do TAE é associada a um aumento da atividade hematopoiética (PARHAR & LALA, 1988; SUBIZA *et al.*, 1989; SEGURA *et al.*, 1997, 2000). Estes achados contribuem para explicar o aumento no número de CFU-GM no baço de animais inoculados com o TAE observado no nosso trabalho. Ademais, observamos um aumento no peso e na celularidade do baço, o qual é consistente com relatos da literatura (SUGIURA *et al.*, 1988; SUBIZA *et al.*, 1989; SEGURA *et al.*, 1997; RUIZ DE MORALES *et al.*, 1999). Neste sentido, nossas observações quanto a capacidade dos extratos da planta em reduzir o peso do baço e normalizar a celularidade esplênica, são particularmente importantes, considerando que alterações desta natureza parecem ser um fenômeno universal dos processos malignos. Assim, a redução do CFU-GM no baço de camundongos tratados com os diferentes extratos da *A. australe* poderia ser atribuída, em parte, a uma diminuição na produção dos fatores derivados das células tumorais responsáveis pela atividade hematopoiética neste órgão.

Uma variedade de mecanismos podem estar envolvidos na depressão funcional de células imunes em animais portadores do tumor de Ehrlich. A intensidade da reação inflamatória evocada por células tumorais é de fundamental importância na evolução do crescimento tumoral. Vários autores descreveram variações no acúmulo de polimorfonucleares na cavidade peritoneal como resultado de um estímulo inflamatório local (TALMADGE *et al.*, 1981; FECCHIO *et al.*, 1990; MANTOVANI *et al.*, 1992; BARTH & MORAHAN, 1994; METCALF *et al.*, 1996). Uma vez que a reação inflamatória gera uma série de fatores de crescimento, citocinas e mecanismos potencialmente citotóxicos, sua ocorrência no local do desenvolvimento de tumores deve ter um papel relevante na evolução destes. Produtos do metabolismo do ácido araquidônico, particularmente prostaglandina E₂ (PGE₂), também exerceriam um papel na evolução do crescimento tumoral, pois PGE₂ regula a proliferação de linfócitos e inibe a atividade tumoricida de macrófagos. Também, está bem estabelecido que PGE₂ exerce uma retroalimentação negativa em macrófagos e que macrófagos de animais portadores de tumor produzem mais PGE₂ do que os de animais normais (PELUS *et al.*, 1979; GOODWIN *et al.*, 1980; BONTA & BEN-EFRAIM, 1993). FECCHIO *et al.* (1990) sugerem que, paralelamente ao crescimento do tumor ascítico de Ehrlich ocorra um aumento na produção de PGE₂, a qual produziria um efeito imunossupressor por inibir as funções dos macrófagos.

Ressaltando o papel de mediadores inflamatórios, foi demonstrado que a PGE₂ favorece a secreção de citocinas pelas células Th2, inibindo a produção das citocinas associadas à resposta tipo inflamatória ou tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ) (BETZ & FOX, 1991; HILKENS *et al.*, 1995). Da mesma forma, TGF- β e IL-6 produzidos principalmente pelas células tumorais levam a uma inibição da produção de IFN- γ (YAMAMOTO *et al.*, 1995; ELGERT *et al.*, 1998). O papel do IFN- γ na ativação dos macrófagos parece estar relacionado à sua capacidade de regular a expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal da classe II bem como

a produção de PGE₂ (ALLEVA *et al.* 1993). SEGURA *et al.* (1997) demonstraram a presença de precursores para TGF- β nas células do TAE e no fluido ascítico proveniente de camundongos portadores do tumor. FECCHIO *et al.*, (1990) demonstraram que a inoculação intraperitoneal de células do TAE não estimulou macrófagos locais. Além disso, um reduzido influxo inflamatório foi observado no sítio de inoculação tumoral e o número de leucócitos peritoneais não apresentou alteração durante sete dias. Portanto, o aumento da sobrevida dos animais inoculados com o TAE e tratados com a dose de 500mg/kg dos extratos da planta poderia estar relacionado ao fato desta planta estimular o acúmulo de granulócitos e macrófagos no sítio de crescimento tumoral, e à possível ativação funcional destas células. Os estudos de, PESSINA *et al.* (1982^{a,b}) sobre os efeitos dos fatores produzidos por macrófagos e células tumorais de Ehrlich nas células precursoras granulocíticas corroboram esta hipótese. Estes autores demonstraram que o fluido ascítico provocou uma redução na proliferação e na diferenciação de células pluripotenciais da medula óssea comprometidas com a série granulocítica (PESSINA *et al.*, 1982^b).

Com respeito a reação do hospedeiro contra o desenvolvimento tumoral, importância vem sendo atribuída às desordens nos processos de maturação celular comprometendo a competência funcional dos macrófagos (FECCHIO *et al.*, 1990). Portanto, é provável que a modulação da mielopoiese proporcionada pelos extratos da *A. australe*, atuando sinergicamente com outros fatores, tais como citocinas específicas, poderia resultar em uma adequada ativação de macrófagos contra as células do tumor. Dessa forma, uma demanda aumentada por células funcionais na carcinogênese poderia ser compensada pela estimulação causada pelos extratos na mielopoiese medular. Ademais, a dose de 500mg/kg dos diferentes extratos mostrou-se particularmente efetiva, proporcionando acentuada modulação da mielopoiese e uma percentagem cumulativa de sobrevida. Apesar dos extratos apresentarem padrões de respostas

semelhantes, é interessante mencionar que os extratos hidroalcoólico e aquoso mostraram-se mais efetivos para reverter a inibição medular causada pelo tumor. Por outro lado, os extratos butanólico e clorofórmico foram mais eficientes em aumentar a sobrevida dos animais inoculados com o TAE.

Diante do exposto podemos, sugerir que a proteção observada com os diferentes extratos da *Acanthospermum australe* se deve, pelo menos em parte, à modulação das atividades hematopoiéticas medular e extramedular alteradas pela presença do tumor.

VI – Conclusões

O presente trabalho sobre precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *Acanthospermum australe* nos permite concluir que:

- a atividade adjuvante dos extratos aumenta o número de CFU-GM da medula óssea além dos níveis basais e reduz a estimulação da hematopoiese esplênica. Além disso, o tratamento com os extratos desta planta contribuiu para aumentar a sobrevida dos animais portadores de tumor.
- a dose mais efetiva foi a de 500mg/kg.

VII – Referências Bibliográficas

- ALLEVA, D.G.; BURGER, C.J.; ELGERT, K.D. - Interferon- γ reduces tumor-induced Ia macrophage-mediated suppression - Role of prostaglandin E₂ Ia, and TNF- α . **Immunopharmacology**, **25**: 215, 1993.
- BALDUCCI, L. & HARDY, C.L. - High proliferation of early hematopoietic progenitors in tumor-bearing mice. **Pathobiology**, **60**: 125, 1992.
- BARTH, M.W. & MORAHAN, P.S. - Role of macrophages in host response to Lewis lung peritoneal carcinomatosis. **Cancer Immunol. Immunother.** **38**: 233, 1994.
- BETZ, M. & FOX, B.S. - Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **J. Immunol.**, **146**: 108, 1991.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; DHART, A.K.; KING, R.M.; ROBINSON, H. - Naturally occurring terpene derivatives parts 331 two sesquiterpene and three diterpene lactones from *Acanthospermum australe*. **Phytochemistry**, **20**: 1081-1083, 1981.
- BOHLMANN, F.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., JAKUPOVIC, J. - New melampolides from *Acanthospermum australe*. **Planta Medica**, 37-39, 1984.
- BONTA, I.L. & BEN-EFRAIM, S. - Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity. **J. Leukocyte Biol.**, **54**: 613, 1993.
- BURGESS, A.W. & METCALF, D. - The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, **56**: 947, 1980.
- CARVALHO, L.H. & KRETTLY, A.U. - Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, **86 (suppl. II)**: 181-184, 1991.
- CARVALHO, L.H.; BRANDÃO, M.G.L.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J.L.C.; KRETTLY, A.U. - Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studies *in vivo* in *Plasmodium berguei* infected in mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **24 (11)**: 1113-1123, 1991.

- CHEN, L. & WATKINS, J.F. - Evidence against the presence of H-2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumor cells. **Nature**, **25**: 734, 1970.
- CHOI, B.G.; KWAK, E.Y.; CHUNG, B.H.; CHO, W.J.; CHEON, S.H. - Synthesis of sesquiterpene derivatives as potential antitumor agents; elemene derivatives. **Arch. Pharmacol Res.**, **22** (6): 575-578, 2000.
- CLERICI, E.; MOCARELLI, P.; VILLA, M.L.; NATALE, N. - Influence of Ehrlich ascites carcinoma and repopulating ability of mouse bone marrow cells. **J. Natl Cancer Inst.**, **47**: 555, 1971.
- DE MARAIS, S.M.; MACHADO, M.I.L.; MACHADO, S.M.F.; FACUNDO, V.A.; MILITÃO, J.S.L.T.; RIBEIRO, A.A. - Essential oil of *Acanthospermum australe* DC. **J. Essent. Oil Res.**, **9** (5): 601-602, 1997.
- DEBENEDETTI, S.; MARTINO, V.; PALACIOS, P.; COUSSIO, J.D. - 6-Methoxy flavonoids from *Acanthospermum australe*. **J. Nat. Prod.** **50**(2): 325, 1987.
- DELMONTE, L.; LIEBELT, A.; LIEBELT, R. - Granulopoiesis and thrombopoiesis in mice bearing transplanted mammary cancer. **Cancer Res.**, **26**: 149, 1966.
- DESMARCHELIER, C.; BERMUDEZ, M.J.N.; COUSSIO, J.; CICCIA, G.; BOVERIS, A. - Antioxidant and prooxidant activities in aqueous extracts of Argentine plants. **Int. J. Pharmacog.**, **35**(2): 116-120, 1997.
- DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, C.M.; HIRUMA, C.A. - Plantas Medicinais na Amazônia, São Paulo, Ed. Universidade Estadual Paulista, 1989. p. 51-52.
- DONALDSON, D.M. & MITCHELL, J.R. - Immunization of mice against Ehrlich's ascites carcinoma with X- irradiated tumor cells. **Proc Exp Biol**, 101-204, 1959.
- EHRlich, P. & APOLANT, T. - Beobachtungen wiber maligne mausetumoren. **Berliner Klinische Wochenschrift**, **28**: 871, 1905.
- ELGERT, K.D.; ALLEVA, D.G.; MULLINS, D.W. - Tumor-induced immune dysfunction: The macrophage connection. **J. Leukoc. Biol.**, **64**: 275, 1998.

- EVANS, R. & ALEXANDER, P. - Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumor immunity. **Nature**, **228**: 620, 1970.
- FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. - Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, **14**: 125, 1990.
- FUJI, K.; NODE, M.; SAI, M.; FUJITA, E.; TAKEDA, S.; UNEMI, N. - Terpenoids.LIII. Antitumor activity of trichorabdal and related compounds. **Chem. Pharm. Bull.** **37(6)**: 1472-1476, 1989.
- GIL, J.; ALVAREZ, R.; VIÑUELA, J.E.; MORALES, J.G.R.; BUSTOS, A.; DE LA CONCHA, E. G.; SUBIZA, J.L. - Inhibition of *in vivo* tumor growth by a monoclonal IgM antibody recongnizing tumor cell surface carbohydrates. **Cancer Res.**, **50**: 7301, 1990.
- GONZÁLEZ, A.; FERREIRA, F.; VASQUEZ, A ; MOYNA, P. ; ALONSO PAZ,E. - Composto antitumoral em testes: Biological screening of Uruguayan medicinal plants. XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Curitiba, 1992. **Abstracts**. Curitiba, 1992. p.33.
- GOODWIN, J.S. & WEBB, D.R. - Regualtion of the immune response by prostaglandins. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **15**: 106-122, 1980
- GUERRA, J.L. - **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de Ehrlich**. São Paulo, 1983. [Tese - Doutorado - FMVZ, USP]
- HARDY, C.L. & BALDUCCI, L. - Review: Hemopoietic alterations in cancer. **Am. J. Med. Sci.**, **290**: 196, 1985.
- HERZ, W. & KALYANARAMAN, P.S. - Acanthospermal A and Acanthospermal B, two new melampolides from *Acanthospermum* species. **J. Org. Chem.** **40**: 3486, 1975.
- HILKENS, C.M.U.; VERMCULEN, H.; JOOST-VAN-NEERVEN, R.J.; SNIJDEWINT, F.G.M.; WIERENGA, E.A.; KAPSENBERG, M.L. - Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E₂ critically depends on interleukin-2. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 59, 1995.

- JUSTO, G.Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M.L.S. - Myelopoietic response in tumour-bearing mice by na aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Eur. J. Pharm.**, **388**: 219-226, 2000.
- JUSTO, G.Z.; SILVA M.R.; QUEIROZ, M.L.S. - Effects of *Chlorella vulgaris* on the response of host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, **23**: 1, 2001. [no prelo]
- KEEB, G. & LALA, P.K - Effect of Ehrlich ascites tumor transplantation in mice the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies *in vitro*. **Eur. J. Cancer**, **14**: 331, 1978.
- KOBARI, L.; WEIL, D.; LEMOINE, F.M.; DUBOIS, C.; THIAM, D.; BAILOU, C.; GUIGON, M.; GORIN, N.C.; NAJMAN, A. - Secretion of tumor necrosis factor-alpha by fresh human acute nonlymphoblastic leukemic cells: role in the disappearance of normal CFU-GM progenitors. **Exp. Hematol.**, **18**: 1187, 1990.
- LALA, P.K.; TERRIN, M, LIND, C.; KRAIZER, L. - Hemopoietic redistribution in tumor-bearing mice. **Exp. Hematol.**, **6**: 283, 1977.
- LITTMAN, M.L.; KIM, Y.C.; SUCK, D.- Immunization of mice to sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma with ultraviolet-killed tumor vaccine. **Proc. Exp. Biol.**, **127**: 7, 1968.
- LORENZI, H. - **Plantas daninhas do Brasil**. 2ª ed. Nova Odessa, SP, Plantarum, 1991. p.47.
- MACHADO, S.M.F.; MELITÃO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A.; RIBEIRO, A.; MORAES, S.M. - Composição do óleo essencial de duas plantas medicinais amazônicas: *Vismia guianensis* e *Acanthospermum australe*. In: XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Fortaleza, 1994. **Abstracts**. Fortaleza, 1994. p.201.
- MANTOVANI, A.; BOTAZZI, B.; COLOTTA, F.; SOZZANI, S.; RUCO, L. - The original and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today**, **13**: 239, 1992.
- MATSUNAGA, K.; SAITOH, M.; OHIZUMI, Y. - Acanthostral, a Novel Antineoplastic cis,cis,cis-Germacrolide from *Acanthospermum australe*. **Tetrahedron Lett.**, **35**: 9, 1455-1456, 1996.

- McKEE, R.W.; GARCIA, E.; TROCH, M.R.; SLATER, C.- Establishment of resistance to growth of Ehrlich ascites carcinoma in C57 black mice. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 102, 591, 1959.
- METCALF, D.- The bioassay of colony stimulating factors. In: hemopoietic colony stimulating factors. Elsevier, Amsterdam, 187-212, 1984.
- METCALF, D.; ROBB, L.; DUNN, A.R.; MIFSUD, S.; DI RAGO, L. - Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. **Blood**, **88**: 3755, 1996.
- MONTGOMERY, DOUGLAS C.- **Design and Analysis of Experiments**. 3rd ed. New York, John Wiley & Sons, 1991.
- RUIZ DE MORALES, J.R; VÉLEZ, D.; SUBIZA, J.L. - Ehrlich tumor stimulates extramedullary hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Exp. Hematology**, **27**: 1757-1767, 1999.
- MURAI, M.; SEKI, K.; SAKURADA, J.; USUI, A.; MASUDA S. - Subcutaneous growth of *Staphylococcus aureus* concomitantly inoculated with Ehrlich ascites tumor cells. **Microbiol. Immunol.**, **39**: 725, 1995.
- NARA, K.; ODAGIRI, H.; FUJII, M.; YAMANAKA, Y.; YOKOYAMA, M.; MORITA, T.; SASAKI, M.; KON, M.; ABO, T. - Increased production of tumor necrosis factor and prostaglandin E₂ by monocytes in cancer patients and its unique modulation by cancer plasma. **Cancer Immunol. Immunother.**, **25**: 126, 1987.
- PARHER, R.S. & LALA, P.K - Prostaglandin E₂-mediated inactivation of various killer lineage by tumor-bearing host macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, **44**: 185, 1988.
- PELUS, L.M.; BROXMEYER, H.E.; KURLAND, J.I.; MOORE, M.A.S. - Regulation of macrophage and granulocyte proliferation. **J. Exp. Med.**, **150**: 277, 1979.
- PESSINA, A.; BAMBILLA, P.; VILLA, S.; MORCARELLI, P. - CFU-S and CFU-C proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich ascitic fluid. **Oncology**, **39**: 391, 1982a.

- PESSINA, A.; BAMBILLA, P.; VILLA, S.; MOROCCHI, A.; MORCARELLI, P. - Factors produced by macrophages and tumor cells: Influence on the granulocytic precursor cells (CFU-C) in normal and tumor bearing mice. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, **102**: 235, 1982b.
- QUEIROZ, M.L.S. - Células pluripotenciais hematopoiéticas em cultura - revisão bibliográfica, **Ciência e Cultura**, **40**: 421, 1988.
- QUEIROZ, M.L.S.; JUSTO, G.Z.; VALADARES, M.; SILVA, F.R.R.P. - Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, 2001. [no prelo]
- QUEIROZ, M.L.S.; JUSTO, G.Z.; VALADARES, M.; SILVA, F.R.R.P.; MÜLLER, A.H.- Adjuvant effect of *Pluchea quitoc* extract on the resistance of tumor-bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, 2001. [no prelo]
- QUITERO, A.; PELCASTRE, A.; SOLANO, J.D. - Antitumor activity of new pyrimidine derivatives of sesquiterpene lactones. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, **2** (3): 108-112, 1999.
- RADUNZ, H.E.; WOLF, M.; BAUMBARTH, M.; KINZY, W.; LUCKENBACH, G.A. - Immunomodulatory diterpenoids. **Ger. Offen. DE 4,055**: 159, 1991.
- RÊGO, T.J.A.S. **Fitogeografia das Plantas Medicinais do Maranhão**. São Luís, EDUFMA, 1993. p.33.
- RHODES, J. - Resistance of tumor cells to macrophages. **Cancer Immunol. Immunother**, **7**: 211-215, 1980.
- RUSSEL, S.W.; GILLESPIE, G.Y.; HANSEN, C.B.; COCHRANE, C.G. - Inflammatory cells in solid murine neoplasms. II. Cell types found throughout the course of moloney sarcoma regression or progression. **Int. J. Cancer**, **18**: 331, 1976.

- SADZUKA, Y.; SUGIYAMA, T.; SONOBE, T. - Efficacies of tea components on doxorubicin induced antitumor activity and reversal of multidrug resistance. **Toxicol. Lett.**, **3**; **114**(1-3): 155-62, 2000.
- SALEH, A.S.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. - Potential anticancer agents: Part 13. Cytotoxic constituents of *Acanthospermum glabratum* (Asteraceae). **J.C.S. Perkin**, 1090-1097, 1979.
- SEGURA, J.A.; BARBERO, L.G.; MARQUEZ, J. - Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Lett.**, **414**: 1, 1997.
- SEGURA, J.A.; BARBERO, L.G.; MARQUEZ, J. - Ehrlich ascites tumor unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters.**, **74**: 111-115, 2000.
- SETHI, K.K. & BRANDIS, H. - Protection of mice from malignant tumor implants by enucleated tumor cells. **J. Natl. Cancer Inst**, **53**: 1175, 1974.
- SHIH, H.; PICKWELL, G.V.; QUATTROCHI, L.C. - Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of human CYP1A2 enhancer. **Arch. Biochem. Biophys.**, **373** (1): 287-294, 2000.
- SHIMIZU, M.; HORIE, S.; ARISAWA, M.; HAYASHI, T.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; KAWASAKI, M.; TERASHIMA, S. - Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. I. Isolation and identification of lens aldose reductase inhibitor from "tapeque" *Acanthospermum australe*. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)** **35** (3): 1234-1237, 1987.
- SIGIURA, K. - Tumor transplantation. In: Methods of animal experimentation, W.I. Gray ed., Academic Press: New York, N.Y., 1965, v. II, 171-172.
- SUBIZA, J.L.; COLL, J.; ALVAREZ, R.; VALDIVIESO, M.; DE LA CONCHA - IgM response and resistance to ascites tumor growth. **Cancer Immunol. Immunother.**, **25**: 87, 1987.

- SUBIZA, J.L.; VIÑUELA, J.E.; RODRIGUEZ, R.; GIL, J.; FIGUEREDO, M.A.; CONCHA, E.G. - Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. **Int. J. Cancer**, **44**: 307-314, 1989.
- TALMADGE, J.E.; KEY, M.; FIDLER, I.J. - Macrophage content of metastatic and non-metastatic rodent neoplasms. **J. Immunol.**, **126**: 2245, 1981.
- TOMIDA, M.; YAMAMOTO, Y.Y.; HOZUMI, M. - Purification of factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. **J. Biol. Chem.**, **259**: 10978, 1984.
- VALADARES, M.C.; KLEIN, S.I.; ZYNGIER, S.; QUEIROZ, M.L.S. - Growth and differentiation of bone marrow hematopoietic cells in mice bearing Ehrlich ascite tumor and treated with dyciclopentadienildichorotitanium IV. **Inter. Journ. Immunopharm**, **20** (10), 573-581, 1998.
- YAMAMOTO, T.; ZOU, J.P.; LI, X.F.; TAKENAKA, H.; NODA, S.; FUJII, T.; KOBAYASHI, Y.; MUKIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; FUJIWARA, H.; MAMAOKA, T. - Regulatory mechanisms for production of IFN- γ and TNF by T-cells or macrophages in tumor-bearing state. **J. Immunol.**, **154**: 2281-2290, 1995.

VIII – Apêndice

Tabela 2. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas do extrato hidroalcoólico da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

Animais	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	13900	23135	19930	20470	8025	20950	27220	16890
2	10550	21005	18550	15375	8200	20110	31400	18150
3	12045	18015	19970	19750	4970	24030	24810	16975
4	10500	18000	20175	16840	6750	19710	24750	19320
5	13200	19150	22010	15780	4955	19910	25120	14310
6	12580	16470	23710	18025	8075	22530	23215	19785
7	12500	20115	25430	14410	6250	19005	27310	13420
8	11985	18000	19020	20700	4573	18990	28200	16600
X	12157	19236	21099	17668	6474	20654	26503	16931
D.P.	1182	2114	2411	2438	1524	1782	2582	2224

Tabela 3. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas do extrato hidroalcoólico da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

Animais	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	1916	2992	1740	1905	16658	2784	4200	3440
2	2062	2610	2890	2515	16510	3200	4080	4100
3	2082	2872	2040	1450	18542	2400	3900	3360
4	1994	2494	2880	1725	17685	2880	3980	3210
5	1900	2040	2270	1985	16998	2790	4280	3442
6	2005	2430	2261	1685	17274	2935	3411	3200
7	1925	2356	2348	1895	17025	3012	3695	3149
8	2245	1992	2090	1725	18075	3476	3800	3821
X	2016	2450	2314	1860	17345	2934	3918	3465
D.P.	114	359	398	312	704	316	283	333

Tabela 4. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas do extrato aquoso da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

Animais	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	13900	15985	13000	10240	8025	24640	20900	16995
2	10550	16325	13530	13450	8200	23420	24680	18600
3	12045	13360	15920	16055	4970	23700	27640	17320
4	10500	14350	15750	16270	6750	19735	23780	21760
5	13200	13680	17320	15580	4955	19875	23145	15325
6	12580	14505	15920	12580	8075	20150	22680	14780
7	12500	16950	14705	10540	6250	25470	22470	19785
8	11985	18200	17920	10100	4573	25990	28500	14900
X	12157	15419	15508	13101	6474	22872	24224	17433
D.P.	1182	1709	1704	2647	1524	2586	2619	2499

Tabela 5. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas do extrato aquoso da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

Animais	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	1916	2822	2550	2768	16658	5226	4575	5885
2	2062	2550	2281	2323	16510	5100	5250	5160
3	2082	1782	2150	2435	18542	4250	4480	4075
4	1994	2740	2080	2889	17685	5310	5294	4021
5	1900	1958	2485	2832	16998	4275	5601	5385
6	2005	2880	2150	2500	17274	4165	5625	5755
7	1925	3300	2792	2147	17025	4225	5950	3987
8	2245	2772	2325	2520	18075	4545	2299	4970
X	2016	2606	2351	2551	17345	4637	5296	4904
D.P.	114	507	242	259	704	492	522	783

Tabela 6. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas do extrato butanólico da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

Animais	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	13900	15760	20535	15475	8025	18365	18900	12555
2	10550	18025	20125	14675	8200	19875	15750	15180
3	12045	15885	22980	13640	4970	14650	19785	15470
4	10500	18440	18350	14280	6750	14875	19480	14670
5	13200	15920	18995	14975	4955	16340	17835	17075
6	12580	17580	17025	15870	8075	15875	22450	19540
7	12500	15690	18475	12125	6250	15250	21210	18968
8	11985	17850	17955	15535	4573	15385	20780	14450
X	12157	16893	19305	14571	6474	16326	19523	15988
D.P.	1182	1180	1867	1227	1524	1848	2088	2375

Tabela 7. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas do extrato butanólico da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

Animais	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	1916	2151	3018	3741	16658	4635	4595	4920
2	2062	1940	3201	3014	16510	3942	4320	5199
3	2082	2389	3547	3654	18542	4360	1957	4911
4	1994	1887	2629	2510	17685	4708	4358	5336
5	1900	2151	1234	2565	16998	1685	5114	4320
6	2005	2237	2730	2440	17274	4354	4971	4075
7	1925	1844	2560	2270	17025	3787	3975	5810
8	2245	1687	2520	2520	18075	3770	4519	6262
X	2016	2035	2679	2839	17345	4280	4601	5104
D.P.	114	233	683	570	704	396	381	721

Tabela 8. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas do extrato clorofórmico da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

Animais	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	13900	12500	13600	13450	8025	19600	24460	16425
2	10550	14760	15755	15550	8200	19785	19675	19860
3	12045	14480	15035	14665	4970	18810	19745	16875
4	10500	13750	12365	12475	6750	15680	24485	19740
5	13200	13480	13770	15830	4955	20110	23585	18250
6	12580	10270	13900	14750	8075	19750	21880	18755
7	12500	14560	14820	13150	6250	16800	20770	16350
8	11985	14880	10735	16990	4573	20820	18750	18860
X	12157	13585	13747	14607	6474	18919	21668	18139
D.P.	1182	1559	1597	1516	1524	1770	2281	1422

Tabela 9. Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas do extrato clorofórmico da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

Animais	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	1916	1620	2592	2184	16658	3471	3770	4264
2	2062	1984	2637	2457	16510	3564	4060	4232
3	2082	1575	3240	1143	18542	2973	3875	4608
4	1994	3037	1800	2789	17685	5086	3981	4308
5	1900	2830	1857	2790	16998	2841	3575	3780
6	2005	1513	1650	2205	17274	4804	3844	3820
7	1925	1963	2270	1870	17025	3511	4680	3950
8	2245	1904	1748	1584	18075	2620	4510	3870
X	2016	2053	2218	2127	17345	3608	4036	4104
D.P.	114	575	561	576	704	895	375	293

X = média

D.P = Desvio Padrão

Tabela 10. Avaliação de sobrevivência de animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (6×10^6 células/animal) e tratados com 100, 500 ou 1000mg/kg por 3 dias consecutivos com os extratos hidroalcoólico, aquoso, butanólico e clorofórmico da *A. australe* e de animais controle (sem tratamento).

Animais inoculados com o TAE													
Hidroalcoólico					Aquoso			Butanólico			Clorofórmico		
Dias	Crtl*	#	▽	Δ	#	▽	Δ	#	▽	Δ	#	▽	Δ
14º dia	3†	2†											6†
15º dia	2†	2†		4†	3†	3†	4†	4†			3†	2†	
16º dia	3†	2†	3†			2†		2†	4†	6†	1†	2†	
17º dia	4†		4†	3†	2†		3†				5†		3†
18º dia			3†		3†			2†	1†	4†	4†		3†
19º dia	3†	5†		4†	3†		3†	3†	4†			4†	
20º dia	5†	5†	3†		5†	4†	4†		2†	4†	3†	2†	2†
21º dia			2†	5†		4†	2†	4†				3†	3†
22º dia					2†	2†	4†	3†	4†			1†	3†
23º dia			3†	4†	1†	1†		1†		4†	2†		
24º dia		3†				2†				2†		2†	
25º dia		1†			1†			3†			2†	1†	
26º dia													
27º dia													
28º dia													
29º dia													
30º dia													
S**	00	00	02	00	00	02	00	00	05	00	00	03	00

** Sobreviventes

* Animais inoculados com o TAE

Animais com TAE +100mg/kg dos extratos

∇ Animais com TAE +500mg/kg dos extratos

Δ Animais com TAE +1000mg/kg dos extratos

† Morte de animais

Controle n = 20

Tratados n = 20

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tabela 11. Peso do baço (mg) de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas dos diferentes extratos da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	167 \pm 22,5	186 \pm 30,4	199 \pm 29,2	188 \pm 30,6	249 \pm 24*	208 \pm 25,7 #	218 \pm 28 #	216 \pm 17,6 #
2	167 \pm 22,5	159 \pm 30,7	149 \pm 33	158 \pm 28,6	249 \pm 24*	199 \pm 25,6 #	203 \pm 29,3 #	184 \pm 27,8 #
3	167 \pm 22,5	191 \pm 27,5	183 \pm 29	183 \pm 29	249 \pm 24*	215 \pm 13,7 #	216 \pm 29,2#	211 \pm 23,8 #
4	167 \pm 22,5	192 \pm 18,8	199 \pm 28,1	216 \pm 19,2	249 \pm 24*	210 \pm 25 #	214 \pm 21,5 #	200 \pm 26,6 #

1 - Extrato hidroalcoólico

3 - Extrato butanólico

2 - Extrato aquoso

4 - Extrato clorofórmico

ANOVA-Turkey; * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao TAE

Tabela 12. Celularidade ($\times 10^5$ cel/mL) da medula óssea de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas dos diferentes extratos da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	22 \pm 8	26 \pm 10	22 \pm 7	29 \pm 10	24 \pm 8	23 \pm 4	19 \pm 3	24 \pm 4
2	22 \pm 8	28 \pm 8	28 \pm 5	19 \pm 4	24 \pm 8	19 \pm 6	19 \pm 5	17 \pm 7
3	22 \pm 8	21 \pm 4	24 \pm 5	21 \pm 4	24 \pm 8	17 \pm 5	29 \pm 4	17 \pm 4
4	22 \pm 8	24 \pm 3	23 \pm 5	28 \pm 7	24 \pm 8	20 \pm 3	26 \pm 3	22 \pm 2

1 - Extrato hidroalcoólico

3 - Extrato butanólico

2 - Extrato aquoso

4 - Extrato clorofórmico

Tabela 13. Celularidade (2×10^5 cel/mL) do baço de camundongos BALB/c não tratados (controle) ou inoculados com 6×10^6 células do TAE e tratados com 3 doses consecutivas dos diferentes extratos da *A. australe*. Sacrificados 24 horas após o último tratamento (n=8 por grupo).

	Controle	Tratado			TAE	Inoculado + Tratado		
		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg		100mg/kg	500mg/kg	1000mg/kg
1	149 \pm 22	151 \pm 30	154 \pm 20	163 \pm 23	198 \pm 25*	151 \pm 25#	155 \pm 16#	154 \pm 25#
2	149 \pm 22	160 \pm 30	153 \pm 30	168 \pm 30	198 \pm 25*	153 \pm 23#	174 \pm 17#	164 \pm 21#
3	149 \pm 22	161 \pm 19	154 \pm 22	158 \pm 21	198 \pm 25*	166 \pm 21#	150 \pm 24#	168 \pm 23#
4	149 \pm 22	161 \pm 28	160 \pm 20	163 \pm 26	198 \pm 25*	171 \pm 28#	159 \pm 23#	154 \pm 30#

1 - Extrato hidroalcoólico

3 - Extrato butanólico

2 - Extrato aquoso

4 - Extrato clorofórmico

ANOVA-Turkey; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao TAE.