

ADRIANA DE MELO

***ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA
DO EXTRATO BRUTO DE WITHANIA SOMNIFERA EM
CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO
DE EHRLICH***

CAMPINAS

2004

ADRIANA DE MELO

***ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA
DO EXTRATO BRUTO DE WITHANIA SOMNIFERA EM
CAMUNDONGOS PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO
DE EHRLICH***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título em Doutor em Farmacologia.*

Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

CAMPINAS

2004

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

*aos meus pais, Luiz e
Bernadete;*

*aos meus irmãos, Andressa,
André;*

*aos meus avós, Antônio e
Aparecida;*

pelo amor que me dedicam.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me conferiu o dom da vida;

À Profa. Dra. Mary L. S. Queiroz, pela amizade, estímulo e apoio ao meu desenvolvimento científico;

À minha família; pelo apoio e incentivo que me dedicaram;

Aos amigos do laboratório CFU-C, pela amizade e cooperação no decorrer das minhas atividades de doutoramento, assim como pelo ambiente de trabalho profundamente agradável e estimulante que me proporcionaram;

Aos meus irmãos, Andressa e André, aos meus cunhados, Felipe e Danilo e ao meu namorado, Fabiano;

Aos profissionais do Departamento de Comunicação Social, Hemocamp;

Ao Departamento de Farmacologia/Hemocentro, que possibilitou a realização deste trabalho;

Às pessoas que direta e indiretamente participaram de mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xix</i>
ABSTRACT	<i>xxiii</i>
1- INTRODUÇÃO	27
1.1-Aspectos Gerais.....	29
1.2-Potencial terapêutico da <i>Withania somnifera</i>	30
1.3-Modelo experimental do Tumor Ascítico de Ehrlich.....	33
2 -OBJETIVOS	35
3- MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1-Animais.....	41
3.2- Tumor Ascítico de Ehrlich.....	41
3.3-Tratamento.....	42
3.4-Cultura Clonal de Precursores Hematopoiéticos de Medula Óssea e Baço de Camundongos (CFU-C).....	42
3.5 Preparação do Meio Condicionado de Células Esplênicas (SCM).....	44
3.6-Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias.....	45
3.7-Efeito direto do extrato de <i>Withania somnifera</i> sobre os progenitores hematopoéticos de granulócitos-macrófagos da medula óssea de animais normais.....	46
3.8-Peso do baço dos animais submetidos aos referidos tratamentos	48
3.9-Obtenção das Células Mononucleares do Baço e Cultura das Células Esplênicas.....	48
3.10-Obtenção do Sobrenadante de Culturas de Células Esplênicas de Camundongos para Dosagem das Citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α	49
3.11-Avaliação das células “Natural Killer”(NK)	51

3.12-Presença de micronúcleos de eritrócitos da medula óssea de camundongos Balb/c.....	52
3.13-Avaliação da Citotoxicidade do Extrato de <i>Withania somnifera</i> através do método de redução do tetrazolium (MTT).....	53
3.14-Realização da curva de sobrevivência.....	54
3.15-Métodos Estatísticos.....	54
4-RESULTADOS.....	55
4.1-Efeitos do extrato de <i>Withania somnifera</i> sobre o número de progenitores hematopoéticos para granulócito e macrófago da medula óssea e do baço (CFU-GM).....	57
4.2-Efeito do extrato de <i>Withania somnifera</i> sobre a produção de fatores estimuladores de colônias de “CSFs”.....	60
4.3-Efeitos <i>in vitro</i> do extrato de <i>Withania somnifera</i> sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos-macrófagos da medula óssea de animais normais.....	61
4.4-Peso do baço dos animais submetidos aos referidos tratamentos.....	62
4.5-Efeitos do extrato de <i>Withania somnifera</i> sobre a resposta proliferativa de células esplênicas.....	64
4.6-Efeitos do extrato de <i>Withania somnifera</i> sobre os níveis de citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α	66
4.7-Efeitos do extrato de <i>Withania somnifera</i> sobre a atividade de células “natural killer”.....	77
4.8-Efeitos do extrato de <i>Withania somnifera</i> sobre a presença de micronúcleos de eritrócitos da medula óssea de camundongos Balb/c.....	79
4.9-Avaliação da Citotoxicidade do Extrato de <i>Withania somnifera</i> através do método de redução do tetrazolium (MTT).....	80

4.10-Efeitos do extrato de <i>Withania somnifera</i> sobre a sobrevivência de animais inoculados com TAE.....	82
5-DISCUSSÃO.....	83
6-CONCLUSÕES.....	95
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
8-APÊNDICE.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	31
Figura 2-	45
Figura 3-	47
Figura 4-	48
Figura 5-	58
Figura 6-	59
Figura 7-	60
Figura 8-	61
Figura 9-	63
Figura 10-	65
Figura 11-	68
Figura 12-	69
Figura 13-	70
Figura 14-	71
Figura 15-	72
Figura 16-	73
Figura 17-	74
Figura 18-	75
Figura 19-	76
Figura 20-	77
Figura 21-	78
Figura 22-	81
Figura 23-	82

ABSTRACT

O câncer é uma das doenças mais prevalentes no Brasil e no mundo. Atualmente, a radioterapia e a quimioterapia são utilizadas como tratamento de primeira escolha para esta doença e caracterizam-se por não possuir toxicidade seletiva, causando sérios efeitos adversos como a inibição da resposta imunológica e a mielossupressão. O desenvolvimento de novas drogas, visando terapias mais eficientes, vem aumentando a procura por fitoterápicos para o tratamento do câncer. A *Withania somnifera* (Ashwagandha) é uma planta bastante utilizada na medicina Ayurvédica devido sua eficácia em uma grande variedade de doenças. Possui sinonímia bastante diversificada sendo conhecida por Cereja de Inverno, Ashwagandha, Ginseng Indiano entre outros nomes. Cresce em áreas subtropicais da Índia, África e oeste da Ásia. A *Withania somnifera* (WS) foi investigada extensivamente durante as últimas três décadas e resultados de estudos envolvendo indivíduos de diferentes faixas etárias e de ambos os sexos demonstram ação terapêutica potente com efeitos tóxicos mínimos. Neste sentido, investigamos os efeitos desta planta sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos [Células formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM)], de camundongos normais e portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), os quais foram tratados com diferentes doses de *Withania somnifera* (20, 50 ou 100 mg/kg/dia). Nestes animais, avaliamos ainda a presença de fatores estimuladores de colônias no soro e a sobrevida. Além disso, foi avaliada também a proliferação de linfócitos e a lise específica de células natural killer (NK), a concentração das citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α nos camundongos inoculados com TAE e tratados com o extrato da planta, bem como a presença de micronúcleos de eritrócitos da medula óssea dos camundongos tratados com o extrato da planta e ciclofosfamida, e por último a citotoxicidade do extrato nas linhagens leucêmicas HL-60, K-562 e MOLT-4. Nossos resultados demonstraram uma eficácia do extrato de *Withania somnifera* no crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos da medula e baço dos camundongos inoculados com TAE. Como já esperado, o TAE produziu concomitantemente a mielossupressão e um aumento no número de CFU-GM esplênico. O tratamento dos animais portadores do TAE com WS (20, 50 e 100 mg/kg) produziu aumento na sobrevida e aumento na mielopoese, além da redução no número de colônias esplênicas e no peso do baço. Quanto à proliferação de linfócitos e a lise específica de células NK, ocorreu uma resposta dose-dependente dos animais inoculados e tratados com

o extrato de WS. Da mesma forma, pudemos observar que o tratamento dos animais portadores do TAE e tratados com a planta impediu a polarização da resposta imunológica Th1-Th2 encontrada nos animais portadores do TAE. Neste sentido, a avaliação dos níveis de IL-1 revelou que a administração das doses de 20, 50 e 100 mg/Kg de WS por 10 dias consecutivos em camundongos normais produziu um aumento significativo ($P < 0,001$) comparado aos grupos controle e inoculados com TAE, em 24 e 48 horas após a incubação. Os resultados obtidos para a produção de IL-6 revelaram níveis estatisticamente mais elevados, em relação aos observados para os animais somente inoculados. Um aumento pronunciado ($P < 0,001$) nos níveis de IL-10 foi observado nos animais inoculados com TAE (24 e 48 horas). Reduções significativas foram observadas nos níveis desta citocina após o tratamento com todas as doses de WS em 24 e 48 horas de incubação, quando comparadas ao grupo inoculado com TAE ($P < 0,001$). Por outro lado, os níveis de IL-10 nos animais normais não foram alterados pelo tratamento com as mesmas doses de WS. Em relação aos níveis de IFN- γ , observamos uma redução significativa nos níveis desta citocina nos animais apenas inoculados com TAE. Por outro lado, houve uma reversão deste quadro quando os animais foram tratados com as doses de 20, 50 e 100 mg/Kg. Os níveis da citocina TNF- α revelaram um aumento significativo desta citocina em relação ao grupo apenas inoculado com TAE. Estes resultados são encorajadores, uma vez que favorecem a utilização do extrato de WS em combinações terapêuticas com outros quimioterápicos visando reduzir a mielotoxicidade e suplementar a eficácia tumoricida desta planta.

ABSTRACT

Cancer is not only one of the most important diseases in Brazil, yet worldwide too. Nowadays, radiotherapy and chemotherapy have been the first choice treatment against this disease, both characterized for their non-selective toxicity that leads to serious adverse effects, amongst which are inhibition of the immunological response and myelosuppression. New drug development seeking more efficient therapy is increasing search for plant-derived drugs to cancer treatment. *Withania somnifera* (Ashwagandha) is quite used in Ayurvedic medicine due to its effectiveness in a great variety of diseases. This plant possesses diversified synonymes, being known as Cherry of Winter, Ashwagandha, Ginseng Indian, among other names. It grows in subtropical areas of India, as well as in some areas of Africa and west Asia. *Withania somnifera* was extensively investigated during the last three decades and the studies involving individuals of different age groups and both sexes demonstrated potent therapeutic action with minimum poisonous effects. In this sense, we investigated *Withania somnifera*'s actions on the growth and differentiation of hematopoietic precursors [granulocyte/macrophage colony cell formation (CFU-GM)] of normal animals and TAE bearers, which were treated with different doses of *Withania somnifera* (20, 50 or 100 mg/kg/dia). We also evaluated the presence of colony stimulatory factors in the animals sera, as well as their survival. Furthermore, we analysed lymphocytes proliferation, specific NK cell lysis, IL-1, IL-6 and IL-10 cytokines, IFN- γ and TNF- α concentrations in treated bearing mice, as well as the presence of bone marrow erythrocyte micronucleus of mice treated with the extract of the plant and cyclophosphamide. We also studied the extract's cytotoxicity in HL-60, K-562 and MOLT-4 leukemic lineages. Our results demonstrated *Withania somnifera*'s effectiveness on hematopoietic precursors growth and differentiation in marrow and spleen TAE-bearing mice. As it was already expected, TAE produced myelosuppression and increased CFU-GM spleen number concomitantly. The treatment of TAE-bearing animals with WS (20, 50 and 100 mg/Kg) produced dose-dependent increase in myelopoiesis, an increase in life time and a reduction in spleen colony number and in spleen weight. All this happened parallel to survival. As to lymphocytes proliferation and specific NK cell lysis, they were also dose-dependent in treated bearing animals. Likewise, we observed that the treated-bearing animals blocked Th2 immune response polarization detected in the TAE-bearing group. Evaluations of IL-1 levels revealed that the administration of 20, 50 and 100 mg/Kg of WS's extract for 10

consecutive days in normal mice produced a significant increase ($P < 0,001$) compared to control and inoculated groups within 24 and 48 hours of incubation. Results obtained from IL-6 production showed statistically higher levels compared to the non-treated bearing group. A pronounced increase ($P < 0,001$) in IL-10 levels was also observed in TAE-bearing animals (24 and 48 hours). Significant reductions were observed in cytokine levels within 24 and 48 hours of incubation after treating the animals with all the stated doses compared to the non-treated bearing group ($P < 0,001$). On the other hand, IL-10 levels in normal animals were not altered by the treatment with the same doses of WS. Concerning IFN- γ levels, we observed a significant reduction in non-treated bearing mice, however this picture was reversed when the same group was treated with 20, 50 and 100 mg/kg doses. Levels of TNF- γ of treated bearing mice significantly increased when compared to the non-treated bearing group. These results are encouraging, once they favor WS extract's use in combined quimiotherapies that seek mielotoxicity reduction and increase the plant's tumoricid effectiveness.

1- INTRODUÇÃO

1.1-ASPECTOS GERAIS

O objetivo principal da pesquisa quimioterápica visa a descoberta de novos agentes capazes de inibir especificamente a multiplicação viral e de células neoplásicas, sem afetar a divisão celular normal. A partir da década de 40, ocorreu enorme progresso na compreensão dos processos neoplásicos, havendo uma rápida expansão no arsenal de agentes citotóxicos disponíveis. Entretanto, o avanço no tratamento de tumores de ocorrência freqüente é ainda modesto. Somente no Brasil, estima-se a ocorrência de aproximadamente 402.190 casos novos e 887.594 óbitos por ano (Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer, 2003). Isto faz do câncer uma doença emergencial, sendo fundamental o desenvolvimento de novas drogas, visando terapias mais eficientes.

Os tratamentos de primeira escolha atualmente empregados na terapia do câncer, a quimioterapia e a radioterapia, são destituídos de toxicidade seletiva, provocando efeitos colaterais graves, dentre eles a inibição da resposta imunológica, crítica para a recuperação do paciente. Neste contexto, citoredução induzida quimicamente tem sido utilizada terapeuticamente não apenas no tratamento de neoplasias, mas também para proteger a medula óssea em situações de transplante deste órgão. O tratamento com tais agentes é limitado principalmente por mielossupressão, além de outros efeitos colaterais em células normais (Fisher e Peters, 1994; Tanosaki *et al.*, 1994; Parker e Pragnell, 1995).

A medula óssea é o sítio principal da hematopoese *in vivo*. Células pluripotenciais dão origem a progenitores de diferentes linhagens, os quais se desenvolvem em células funcionais maduras. Uma medida quantitativa da capacidade proliferativa hematopoética é obtida através dos sistemas de cultura de células progenitoras em meio semi-sólido *in vitro*, em presença de fatores estimuladores de colônias (CSFs). Nestas culturas, as células progenitoras comprometidas com o crescimento de uma determinada linhagem são capazes de proliferar e formar colônias (CFU) de células maduras. Estes sistemas de cultura clonal são bastante eficientes na detecção e quantificação das células progenitoras. Além disso, pelo fato da proliferação destas células ser acompanhada de diferenciação, estas culturas permitem a análise de muitos aspectos da biologia de formação da célula sanguínea, relacionando cada população clonal madura com a respectiva célula precursora individual inicial (Metcalf, 1984^a; Queiroz, 1988)

Se o desenvolvimento de culturas clonais para o estudo de precursores hematopoéticos representou um grande passo na hematologia experimental, uma consequência ainda mais importante destes trabalhos foi o reconhecimento de que as células sanguíneas necessitam do estímulo de moléculas reguladoras específicas para que possam se dividir e amadurecer. Este fato levou ao descobrimento de uma família de glicoproteínas denominadas fatores estimuladores de colônias (CSFs), que interagem para controlar a proliferação e diferenciação de células hematopoéticas maduras. Os CSFs estão presentes no plasma e urina e já foram isolados de linfócitos, macrófagos e células endoteliais, especialmente após a exposição à antígenos, xenobióticos ou endotoxinas. Neste sentido, a avaliação da atividade estimuladora do soro *in vitro* constitui um indicador adicional da atividade hematopoética do hospedeiro.(Metcalf, 1984^b; Metcalf, 1986).

Alterações hematopoéticas constituem um fator limitante no estabelecimento de regimes quimioterapêuticos e radioterapêuticos, uma vez que as altas doses requeridas na reversão do processo patológico resultam em mielossupressão. Os modelos clonais de hematopoese *in vitro* têm sido utilizados na investigação dos mecanismos patogênicos de doenças induzidas por drogas no sangue e em estudos pré-clínicos de desenvolvimento de novos fármacos. Estes estudos adquirem importância ainda maior se considerarmos que a medula óssea é o alvo mais provável da ação de xenobióticos (Froquet *et al.*, 2001).

1.2-POTENCIAL TERAPÊUTICO DA *WITHANIA SOMNIFERA*

Plantas medicinais têm sido utilizadas como fontes para descobertas de novas drogas. No Brasil existe cerca de 120 mil espécies vegetais das quais acredita-se que 20% sejam medicinais. Destas, apenas cerca de 3 mil espécies foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e/ou farmacológico (Barata, 1991; Souza e Souza Brito, 1993). A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população utiliza plantas para tratamento de doenças primárias (Who, 1993). A investigação destas plantas permite a descoberta de novos fármacos e muitas vezes a elucidação do mecanismo de ação de uma substância até então pouco estudada.

A *Withania somnifera* é uma planta da família Solanaceae, ereta, herbácea que cresce 1,25 m. de altura. As folhas são simples, pecioladas, com até 10 cm de comprimento, em brotos vegetativos são alternadas e grandes; enquanto nas formas florais são opostas e

organizam-se lateralmente em pares, tendo no axis um agrupamento de cinco a vinte e cinco flores verde pálidas imperceptíveis. O fruto, incluso no cálice persistente verde, é uma baga com 5 mm de diâmetro, verde quando verde, laranja avermelhado quando amadurece, e contém numerosos capsicum como sementes (Majeed *et al.*, 2000) (Fig.1).



Figura 1-Ilustração da planta Ashwagandha (*W. somnifera*).

Possui sinonímia bastante diversificada sendo conhecida por Cereja de Inverno, Ashwagandha, Ginseng Indiano entre outros nomes. É uma planta bastante utilizada na medicina tradicional da Índia, principalmente entre os médicos Ayurvédicos, isolada ou em combinação com outros produtos. Cresce em áreas sub-tropicais na Índia, bem como em algumas áreas da África e oeste da Ásia.

Várias substâncias químicas são encontradas nas folhas e raízes de *W. somnifera* (Power e Salway, 1911; Kurup, 1956). Estas pertencem à classe de alcalóides (Atal e Grupta, 1968; Lavie *et al.*, 1968), lactonas esteroidais (chamadas withanolídeos), e glicosídeos acilestéris (chamados sitoindosídeos). Além disso, uma mistura de ácidos graxos tem sido isolada. Atualmente, 16 alcalóides e mais de 30 withanolídeos têm sido isolados e caracterizados. Algumas das lactonas extraídas destas espécies (Withaferina-A e withanolídeos D e E) têm propriedades citotóxicas interessantes (em modelos animais e *in vitro*).

A *Withania somnifera* foi investigada extensivamente durante as últimas três décadas e resultados de estudos envolvendo indivíduos de diferentes faixas etárias e de ambos os sexos demonstram ação terapêutica potente com efeitos tóxicos mínimos. Neste sentido, foi demonstrada atividade anti-hepatotóxica em camundongos e ratos expostos a doses tóxicas do tetracloreto de carbono (Sudhir *et al.*, 1986; Majeed *et al.*, 2000).

O potencial anti-inflamatório desta planta parece ser decorrente da ação dos seus componentes withanolídeos na regulação de síntese protéica (Sadique e Anabalagan, 1982). Estudos pré-clínicos sugerem eficácia no tratamento do mal de Alzheimer, sendo o mecanismo de ação atribuído ao seu comportamento como receptor agonista do GABA (ácido gama-amino butírico) (Kuppurajan *et al.*, 1980). A *W. somnifera* é também caracterizada como adaptogênico, pois alivia o estresse físico e psicológico, com ações anti-inflamatória, tranquilizante, anti-helmíntica, afrodisíaca, entre outras (Karnick, 1981; Singh *et al.*, 1989; Jayaram *et al.*, 1993).

Estudos experimentais demonstram uma atividade significativa desta planta na prevenção e regressão da tumorigênese através de um aumento da atividade quimiotática de macrófagos e da produção de citocinas, e do aumento das interleucina 1 e fator de necrose tumoral alfa (Dhuley *et al.*, 1997).

Modelos experimentais são ferramentas úteis para avaliar-se os efeitos de determinadas drogas ou substâncias sobre o sistema imunológico.

1.3-MODELO EXPERIMENTAL DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

O estudo de neoplasias em modelos animais facilita a avaliação e melhor compreensão da imunologia dos tumores, ao mesmo tempo que constitui instrumento apropriado para a investigação de efeitos imunomoduladores de substâncias com potencial antineoplásico. Um desses modelos é o tumor de Ehrlich, descrito por Ehrlich e Apolant em 1905 como um adenocarcinoma de mama, que teve origem espontaneamente em camundongos. O tumor de Ehrlich caracteriza-se por não regredir espontaneamente e ser um tumor 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).

A influência do crescimento tumoral na proliferação e diferenciação das células pluripotentes (CFU-S) e nas células progenitoras (CFU-C) da medula óssea tem sido sugerida por inúmeras observações. Como muitos outros tumores experimentais, o tumor de Ehrlich produz alterações severas no sistema hematopoético do hospedeiro, sendo frequentemente associadas com imunodepressão, anemia, trombocitopenia e leucocitose granulócito-dependente (Lala *et al.*, 1977; Keeb e Lala, 1978; Roy *et al.*, 1981; Pessina *et al.*, 1982^{a,b}; Hardy e Balducci, 1985; Parhar e Lala, 1985, 1988; Nelson *et al.*, 1990; Parker e Pragnell, 1995). Estes eventos resultariam da produção de fatores solúveis pelas células tumorais ou da interação entre a célula imunocompetente-célula tumoral (Pelus *et al.*, 1979; Burgess e Metcalf, 1980; Pessina *et al.*, 1982^{a,b}; Broxmeyer, 1987; Kobari *et al.*, 1990; Bonta e Bem-Efraim, 1993). Utilizando a técnica de cultura de células precursoras mielóides em meio semi-sólido, Keeb e Lala (1978) demonstraram uma diminuição das células da medula óssea comprometidas com o desenvolvimento de colônias de granulócitos-macrófagos em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Além disso, Pessina *et al.* (1982^a) estudaram os efeitos de fatores produzidos por macrófagos e células tumorais de Ehrlich sobre as células precursoras granulocíticas-macrofágicas. Neste sentido, prostaglandinas da série E (PGE), particularmente PGE₂, e TGF- β , produzidos por diferentes populações de células com atividade supressora, incluindo a própria célula tumoral, estariam associados aos mecanismos de imunossupressão da medula óssea (Ye *et al.*, 1984; Young *et al.*, 1989; Fecchio *et al.*, 1990^{a,b}; Duffie e Young, 1991; Bogdan *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1992; Saarloos *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1992; Bonta e

Bem-Efraim, 1993; Oghiso *et al.*, 1993; Vodovotz *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1996; Elexpuru *et al.*, 1997). Estes fatos são particularmente importantes ao se considerar que o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich provoca uma reação inflamatória local, altera padrões de migração celular, além de estimular/ativar macrófagos. Na verdade, a intensidade da reação inflamatória provocada pelas células tumorais é de fundamental importância na evolução do crescimento tumoral (Talmadge *et al.*, 1981; Nara *et al.*, 1987; Fecchio *et al.*, 1990^a; Mantovani *et al.*, 1992; Bonta e Bem-Efraim, 1993; Barth e Morahan, 1994).

As células maduras do sistema imunológico são originárias da atividade proliferativa de populações precursoras localizadas principalmente na medula óssea. A técnica para cultura de células precursoras da medula óssea em meio semi-sólido forneceu uma nova metodologia para a investigação dos mecanismos reguladores da mielopoiese. Os fatores estimuladores de colônias (CSFs) regulam o crescimento e diferenciação destas células precursoras hematopoéticas, as chamadas células formadoras de colônias (CFCs) (Metcalf, 1984^a; Queiroz, 1988). Além destes efeitos, estes fatores são responsáveis pela sobrevivência *in vitro* e atividade funcional das células maduras (granulócitos, macrófagos, eosinófilos, etc).

Diante do exposto, neste trabalho avaliamos os efeitos do extrato de *Withania somnifera* (Ashwagandha) sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos da medula óssea/baço para a série granulócitos-macrófagos (GM-CFU) no modelo experimental proposto. Além disso, investigamos os efeitos deste extrato sobre a resposta específica ao tumor através das citocinas produzidas pelas subpopulações de células T auxiliares denominadas “T helper” (Th1)-IFN- γ e (Th2)-IL-10, e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1), a produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoéticas, alterações no peso do baço, a atividade de células NK. Também estudamos a citotoxicidade e genotoxicidade deste extrato, através do método de redução do tetrazolium (MTT) e através da presença de micronúcleos de eritrócitos da medula óssea, respectivamente.

2- OBJETIVOS

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Avaliar os efeitos do extrato de *Withania somnifera* (WS) (Ashwagandha) sobre a resposta imunológica inespecífica de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich, através da cultura clonal de precursores hematopoéticos de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e do baço.
2. Avaliar a produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoéticas;
3. Avaliar alterações no peso do baço;
4. Avaliar a resposta imunológica tipo celular através da detecção do nível das citocinas IFN- γ , IL-10 e das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α produzidas em culturas de células esplênicas estimuladas com Concanavalina A (ConA);
5. Avaliar a atividade de células Natural Killer (NK);
6. Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do extrato WS através do método de redução do sal de tetrazólio (MTT) por células leucêmicas e presença de micronúcleos de eritrócitos respectivamente.
7. Avaliar a sobrevida de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com diferentes doses (20, 50 e 100 mg/kg) de *Withania somnifera*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1-ANIMAIS

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c, com idade aproximada de 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram divididos em grupos (n=6 animais/grupo), e cada grupo foi submetido ao tratamento de acordo com o protocolo de experimentos a saber:

- a) animais controle, sem tratamento;
- b) animais inoculados com tumor de Ehrlich;
- c) animais inoculados com tumor de Ehrlich, submetidos a diferentes protocolos de tratamento com WS;
- d) animais controle, não inoculados com tumor de Ehrlich, submetidos aos mesmos tratamentos com WS empregados no item c.

A administração do WS será realizada por via oral em doses padronizadas, utilizando-se solução salina 0,9% como veículo de administração. Aos animais controle não inoculados foi administrado WS em diferentes doses durante 10 dias. Os animais inoculados e tratados receberam WS durante 10 dias. Os animais portadores de tumor foram inoculados 2 horas antes do início do tratamento. As doses utilizadas de WS foram 20, 50 e 100 mg/kg.

3.2-TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

A linhagem tumoral de Ehrlich foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Szulim Zyngier, Departamento de Farmacologia (ICB-USP), sendo originalmente obtida de uma linhagem do Hospital do Câncer, São Paulo. Ela é mantida nas dependências do laboratório através de passagens sucessivas intraperitoneais entre animais.

As células tumorais de Ehrlich crescem como células ascíticas na cavidade peritoneal de camundongos, facilitando sua manutenção através de passagens consecutivas. Para o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich, camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 0,2 mL de uma suspensão de células tumorais contendo 3×10^7

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 tumorais foram determinados através da exclusão do corante azul-tripán, em câmara de Neubauer.

3.3-TRATAMENTO

O extrato da *Withania somnifera* (WS) é um pó marrom claro a marrom escuro com odor e sabor e foi gentilmente cedida da Galena Indústria Farmacêutica Ltda. (Brasil).

Para o tratamento dos animais, o WS foi ressuspensão em água destilada e administrado nas doses de 20, 50 e 100 mg/kg por via oral (gavagem), durante 10 dias consecutivos conforme protocolo experimental item 3.1.

3.4-CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOIÉTICOS DE MEDULA ÓSSEA E BAÇO DE CAMUNDONGOS (CFU-C)

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que as condições de cultura sejam ajustadas para se evitar um número exagerado de colônias em cada placa de petri com consequente superposição das mesmas, de modo a permitir a identificação de cada colônia. Também é importante que o fator estimulador de crescimento (SCM) seja utilizado em concentrações supramáximas. Além disso, a escolha do soro bovino fetal deve ser feita cuidadosamente devido a variação na atividade dos vários lotes e marcas.

Remoção da Medula óssea dos Animais

Após sacrificar o animal através do deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool 70%. Após exposição do fêmur removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior.

A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 5 mL de meio de cultura RPMI (Cultilab).

O número de células na suspensão foi contado em câmara hemacitométrica após diluição (1:10) das células em eosina 1% e a concentração da suspensão celular ajustada para 1×10^5 células/mL.

Remoção do Baço dos Animais

Após a retirada da medula óssea, realizou-se uma pequena incisão na região lateral esquerda da cavidade peritoneal e o baço foi removido com auxílio de uma pinça, sendo em seguida lavado em solução salina estéril e transferido para um tubo contendo 9 mL de meio RPMI-1640 (Cultilab). A seguir o baço dos animais será macerado para obtenção de uma suspensão celular.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hemacitométrica após diluição (1:20) das células em azul de tripan 1% e a concentração da suspensão celular ajustada para 2×10^5 células/mL.

Preparação das Placas de Cultura da Medula Óssea e Baço em meio semi-sólido

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

- 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Sigma) 2x concentrado;
- 20% de soro bovino fetal (SBF);
- 50% de ágar (0,6%) (concentração final 0,3%).

A seguir, adiciona-se ao meio o volume apropriado de células a 37°C. Ressuspendeu-se as células e distribuiu-se volumes de 2 mL em cada placa de petri (35 mm), já contendo o estímulo apropriado. Deixou-se geleificar e incubou-se por 7 dias a 37°C em presença de 5% de CO₂. Após este período contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecação com aumento de 40x.

3.5-PREPARAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS (SCM)

Baços de camundongos BALB/c foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril. Preparou-se uma suspensão com $2,0 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI- 1640 (Sigma) contendo 10% de soro humano inativado (30 min. a 56°C) ou 19% de soro fetal bovino. Adicionou-se ao meio $5,0 \times 10^{-5}$ M de 2-mercaptoetanol (concentração final) e 0,05 mL de “ pokeweed mitogen “ por mL de meio. Incuba-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar. Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em filtros milipore. A atividade funcional do CSF será determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas em meio semi-sólido. A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 forneceu resultados que estão dentro dos níveis de resposta supramáxima. Os resultados em duplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na Tabela 1. O estudo morfológico das colônias após coloração indicou o predomínio de colônias de granulócitos e macrófagos.

Tabela 1-Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c*

DILUIÇÃO SCM	CFU-GM ^a
1:1	109,2±4,2
1:2	102±3,5
1:4	105,6±5,1
1:8	75,6±4,2
1:16	57,6±4,0
1:32	34,8±3,0
1:64	7,2±1,2
1:168	0

*Número de células da medula óssea utilizado= 1×10^5 células/mL.

^a Resultados obtidos em duplicata por diluição.

3.6-OBTENÇÃO DO SORO DOS ANIMAIS PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DOS FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS

O sangue dos animais dos grupos experimentais, foi obtido do plexo ocular, sendo separados em “pools”, centrifugado para obtenção do soro e armazenado a -20°C . A presença de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais em questão foi determinada pela sua capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais normais.

A atividade estimuladora de colônias foi expressa em unidades por mL e determinada a partir da curva de titulação do meio condicionado de células esplênicas. De acordo com Van Den Engh e Bol (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de clones é considerada como 1 unidade de CSF (Figura 2).

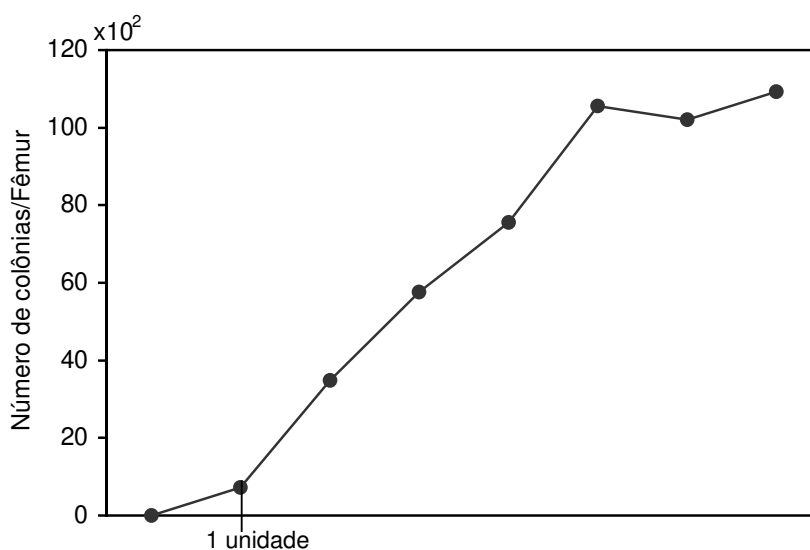


Figura 2-Curva de capacidade estimuladora do crescimento de colônias expressa em unidades.

3.7-EFEITO DIRETO DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* SOBRE OS PROGENITORES HEMATOPOÉTICOS DE GRANULÓCITOS-MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS NORMAIS

O extrato de *Withania somnifera* foi diluído em salina/DMSO 0,1%. Diferentes concentrações, 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL, num volume final de 100 µL, foram adicionadas em culturas progenitoras de medula óssea de animais normais. Culturas controle receberam somente o solvente da droga. O fator estimulante de colônias para granulócitos-macrófagos (rmGM-CSF) foi fornecido por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). O rmGM-CSF é um ácido glicoprotéico com peso molecular de 22 KDa expresso em fator recombinante *Escherichia coli*. A formação de colônias foi estimulada por inclusão nas culturas de 0,5 ng/mL de GM-CSF quando 1×10^5 células da medula óssea foram cultivadas em 1 mL de ágar. Esta concentração de rmGM-CSF foi determinada por uma curva linear de dose-resposta realizada em nosso laboratório antes do início dos experimentos (figura 3).

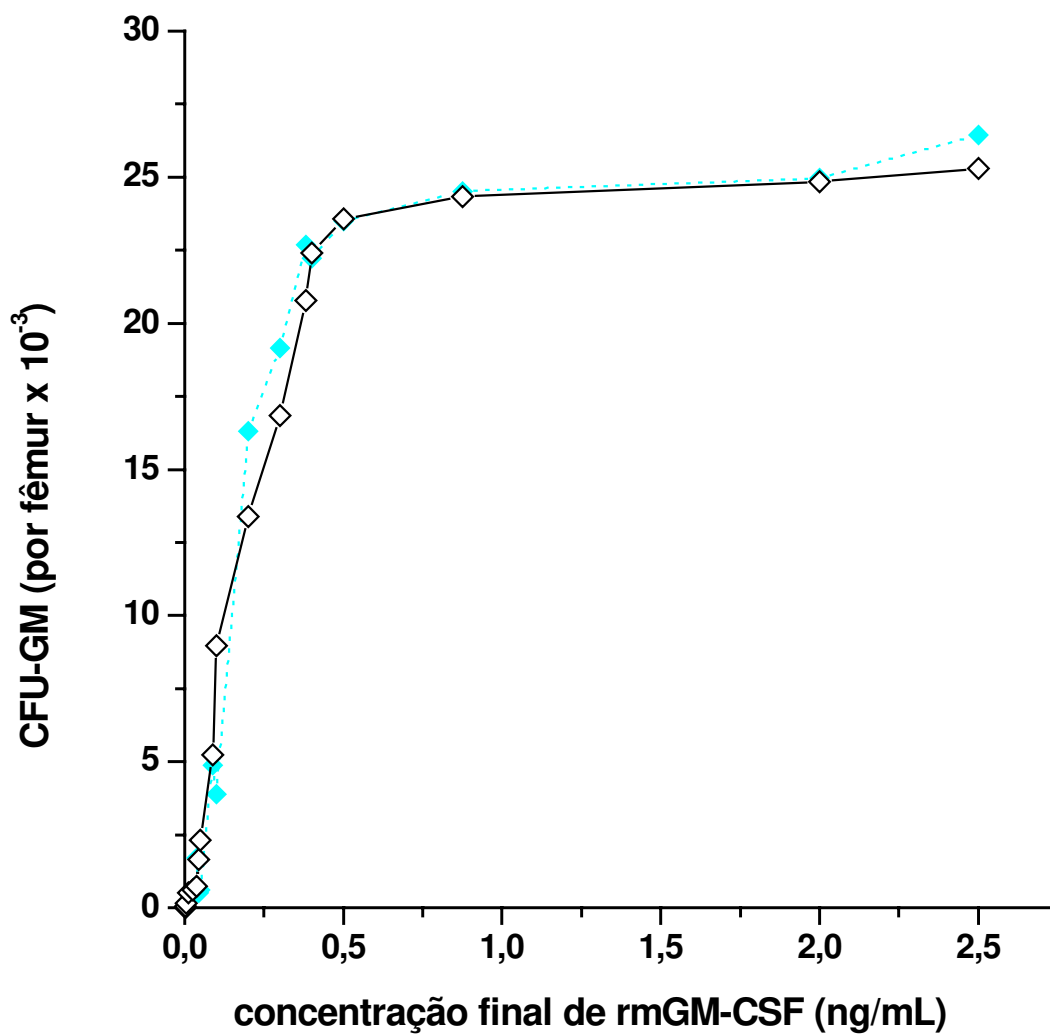


Figura 3-Curva linear de padronização de rmGM-CSF. A formação de colônias foi estimulada por inclusão nas culturas de 0,5 ng/mL de rmGM-CSF quando 1×10^5 células da medula óssea foram cultivadas em 1 mL de ágar.

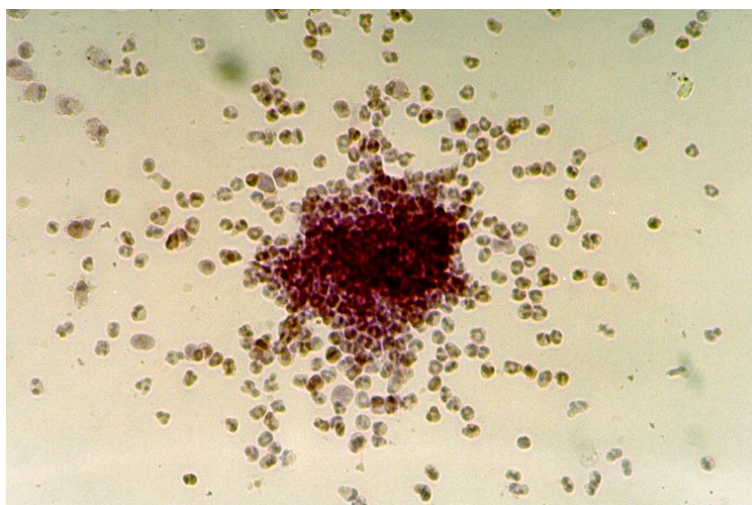


Figura 4-Fotomicrografia de uma colônia de células progenitoras hematopoéticas da medula óssea (CFU-C) de animal normal. A colônia foi fixada com glutaraldeído (2,5%) e corada com Luxol Fast Blue/hematoxilina. Aumento 20X.

3.8-PESO DO BAÇO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AOS REFERIDOS TRATAMENTOS

Após remoção do baço (ver seção 3.4), seu peso foi mensurado em miligramas para posterior análise.

3.9-OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO E CULTURA DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS

A capacidade proliferativa de linfócitos é uma prova que avalia as propriedades funcionais dos linfócitos de acordo com a sua resposta *in vitro* a mitógenos, como a concanavalina A (Con A; Sigma Chemical Co, USA). Nesta prova é verificada a competência funcional dos linfócitos e não o seu número, determinando desta forma a resposta imunológica, através do método de redução do tetrazolium.

Obtenção das Células Mononucleares do Baço

Os baços de camundongos foram coletados assepticamente e homogeneizados, com auxílio de um macerador, utilizando-se meio RPMI-1640 (Cultilab). As células mononucleares foram obtidas adicionando-se tampão de lise (NH_4Cl 0,85% - Tris 15 mM, pH7,2) ao botão celular previamente concentrado. Após 3 lavagens com meio RPMI, as células foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, USA) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina (100 μg), hepes 25 mM, 2-mercaptoetanol (1:100) e glutamina (216 mg/mL).

Transformação Blástica de Linfócitos

Nos orifícios da placa de microcultura de 96 orifícios foram adicionados 200 μL da suspensão celular (item 3.8.1) enriquecida com 5% de SBF e 10 μL de solução de Con A (concentração final de 2,5 $\mu\text{g/mL}$). Concomitantemente foram incubadas células de cada amostra sem Con A. O ensaio foi realizado em triplicata para cada animal. As placas foram mantidas 72 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 . Após este período, a solução de MTT (Kit – Boehringer Mannheim) foi adicionada e a placa de cultura foi incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionou-se a solução solubilizante do MTT e efetuou-se a leitura em ELISA a 570 nm.

3.10-OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURAS DE CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS PARA DOSAGEM DAS CITOCINAS IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ E TNF- α

Obtenção do Sobrenadante de Culturas de Células T Esplênicas

Para a dosagem da citocina foi utilizado o sobrenadante de culturas de células T esplênicas. As suspensões celulares utilizadas nestas culturas foram preparadas conforme descrito no item 3.9.

Nos orifícios da placa de cultura (24 wells) contendo 800 μL de meio RPMI-1640 enriquecido com 5% de soro bovino fetal, penicilina (100 μg), hepes 25 mM, 2-mercaptoetanol (1:100) e glutamina (216 mg/mL) foram adicionados 200 μL da suspensão celular (1×10^6 células/mL) e 50 μL de Con A (concentração final: 2,5 $\mu\text{g/mL}$). A placa foi incubada em estufa úmida contendo 5% de CO_2 , a 37°C. Após 24 e 48 horas, os

sobrenadantes correspondentes a cada amostra foram coletados dos orifícios e armazenados a -20°C para a dosagem das citocinas em estudo. Com o objetivo de verificar estimulação espontânea, foram incubadas células de cada amostra na ausência de estímulo (Con A).

Dosagem de Citocinas pelo Método Imunoenzimático – ELISA de Captura

A dosagem das citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-10 foi realizada pelo método imunoenzimático – ELISA de captura (Pharmingen, USA) utilizando-se os seguintes Kits (BD OptEIA™ ELISA Set) :

- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IL-1 α (Catálogo número 550347).
- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IL-6 (Catálogo número 555240).
- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse TNF- α (Mono/Mono) (Catálogo número 555268).
- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IFN- γ (Catálogo número 555138).
- BD OptEIA™ ELISA Set Mouse IL-10 (Catálogo número 555252).

Os sobrenadantes obtidos nas culturas foram colocados em microplacas de 96 orifícios (NUNC- Maxisorp, DM) sensibilizadas adicionando-se 100 μ L dos anticorpos de captura diluídos em tampão PBS (pH 7,0) dos respectivos kits e incubou-se “overnight” a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/Tween) e as reações inespecíficas bloqueadas com 200 μ L de PBS contendo 10% de SBF (PBS/SBF) por 1 hora a temperatura ambiente. Os sobrenadantes das outras culturas das células esplênicas e os padrões (anticorpos recombinantes diluídos em PBS/SBF) foram adicionados em duplicata e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS/Tween e os anticorpos monoclonais anti-citocina de camundongo marcados com biotina diluídos em PBS/SBF foram adicionados. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS/Tween. Adicionou-se 100 μ L de uma solução de avidina-peroxidase (Sigma Chemical Co,USA) diluída em PBS/SBF (1:400 de uma solução 1 mg/mL). Após 30 minutos de incubação, adicionou-se 100 μ L do substrato

(10 μ L H₂O₂ 30% e 5 mg de dihidroclorato de o-fenilenodiamina (Sigma) em 10 mL de tampão citrato, pH 4,35). Dihidroclorato de o-fenilenodiamina é um cromógeno apropriado para o uso em protocolos de ELISA que utilizam conjugados com peroxidases. Assim, a enzima avidina-peroxidase atua sobre este substrato havendo formação de um produto final solúvel e de cor castanha. A formação do produto final foi lida espectrofotometricamente a 492 nm em um leitor de ELISA (Labsystem). Visto que a relação entre os valores de absorbância a 492 nm e as concentrações padrões de citocina presentes na solução descreve uma função linear, pode-se calcular a concentração de citocina presente na amostra. Os resultados serão expressos em pg/mL.

3.11-AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS “NATURAL KILLER” (NK)

Manutenção e preparo das células alvo

Para o ensaio de atividade das células Natural Killer (NK), as células alvo utilizadas pertencem a linhagem tumoral YAC-1, linfoma de célula T originário A/SN induzido pelo vírus Moloney, adaptado para crescer em cultura líquida (Cikes, Friberg e Klein, 1973). Esta linhagem celular cresce em suspensão e é mantida em cultura contínua *in vitro* em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

Em relação ao ensaio de citotoxicidade, 5 x 10⁶ células alvo foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% SBF e ressuspensas em 0,2 mL de SBF. Em seguida, as mesmas foram marcadas com 100 μ Ci de Na₂ ⁵¹CrO₄ por um período de 90 minutos a 37°C sob agitação periódica. Novamente, lavou-se e ressuspendeu-se as células em meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF e ajustou-se a concentração de 1 x 10⁵ células por mL.

Células efetoras esplênicas

Vinte e quatro horas após a inoculação do tumor ascítico de Ehrlich, baços de camundongos foram coletados assepticamente e homogeneizados utilizando-se meio RPMI-1640. As células mononucleares foram separadas em gradiente ficoll-hypaque (d=1,089), lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 completo

suplementado com 10% de SBF e incubadas em placa de petri de plástico (100x20 mm) por 2h em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células não aderentes (sobrenadante) foram cuidadosamente aspiradas da placa, lavadas e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640 completo suplementado com 10% de SBF, ajustando-se a concentração para 5 x 10⁶ células por mL. A atividade citotóxica das células NK foi avaliada contra as células alvo YAC-1 em ensaio de liberação de Cr ⁵¹.

Ensaio de liberação de ⁵¹Cr

Em microplacas de cultura (Corning – 96 wells) foram adicionados 100µL da suspensão de células efetoras, efetuando-se diluições seriadas em triplicatas, e com reserva de três orifícios para a lise espontânea (100 µL de SBF ou meio de cultura).

A seguir, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm e 100µL do sobrenadante foram transferidos para tubos plásticos. A leitura foi realizada em contador gama e os resultados expressos em porcentagem de lise específica.

$$\text{Porcentagem de lise específica} = \frac{\text{lise teste} - \text{lise espontânea}}{\text{lise máxima} - \text{lise espontânea}}$$

3.12-PRESENÇA DE MICRONÚCLEOS DE ERITRÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS BALB/C

O ensaio do micronúcleo das células da medula óssea de camundongos Balb/c foi realizado de acordo com o protocolo descrito por MacGregor *et al.* (1987). O número de células micronucleadas foram contadas em 1000 eritrócitos policromáticos por animal. As lâminas foram analisadas usando microscópio óptico de imersão 100 vezes.

A porcentagem de redução na frequência de micronúcleo (Mni), foi calculada de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters *et al.* (1990), através da seguinte fórmula:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{\text{frequência de Mni em A} - \text{frequência de Mni em B}}{\text{frequência de Mni em A} - \text{frequência de Mni em C}} \times 100$$

onde A é o grupo tratado (i.p.) com 200 mg/Kg de ciclofosfamida (controle positivo); B é o grupo tratado com diferentes doses (20, 50 ou 100 mg/Kg) *Withania somnifera* por 10 dias consecutivos e 200 mg/Kg de ciclofosfamida; e C é o grupo tratado com 0,9% de NaCl (controle negativo).

3.13-AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* ATRAVÉS DO MÉTODO DE REDUÇÃO DO TETRAZOLIUM (MTT)

Neste teste, tanto a proliferação como a citotoxicidade celulares podem ser avaliadas através de um sistema de oxi-redução mitocondrial. Desta forma, o tetrazolium é reduzido através das células viáveis, formando o sal de formazan, o qual deverá ser solubilizado para a leitura das células viáveis através de ELISA a 570 nm (absorbância máxima).

Procedimento

As células da linhagem celular HL-60, K-562 e Molt-4 foram incubadas com 6 diferentes concentrações do extrato em estudo. A seguir, as mesmas foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ no ar, por 4 dias. Após este período, a solução de MTT (Kit – Boehringer Mannheim) foi adicionada e a placa de cultura foi incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionou-se a solução solubilizante do MTT e efetuou-se a leitura em ELISA a 570 nm e a citotoxicidade celular do extrato em estudo foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Células viáveis} = \frac{\text{Absorbância por well} \times 100}{\text{Média da absorbância do controle}}$$

Média da absorbância do controle

A concentração letal 50% (CL50) foi definida como a concentração da droga que resulta em 50% de sobrevivência. A qual foi derivada de uma curva dose-resposta (Mosmann, 1983).

3.14-REALIZAÇÃO DA CURVA DE SOBREVIDA

Com o intuito de observar uma possível proteção dos animais tratados com o WS realizou-se uma curva de sobrevivência. Foram considerados quatro grupos experimentais: animais controles e portadores de TAE, animais tratados com WS nas doses de 20, 100 ou 100 mg/kg por 10 dias consecutivos, sendo inoculados com 6×10^6 células/animal de TAE 2 horas antes do início do tratamento com WS.

3.15-MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para a avaliação das variáveis CFU-GM utilizou-se análise de variância. Quando detectado diferenças estatísticas entre os grupos utiliza-se o teste de contraste de Tukey. Para a avaliação das variáveis IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram verificadas utilizando-se ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon. Para a curva de sobrevivência dos grupos portadores de TAE, e os grupos inoculados com TAE e tratados utilizou-se o teste Log-rank. Para todos os grupos considerou-se estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1-EFEITOS DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* SOBRE O NÚMERO DE PROGENITORES HEMATOPOÉTICOS PARA GRANULÓCITOS-MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO (CFU-GM)

Os efeitos da administração do extrato de *Withania somnifera* por 10 dias consecutivos, nas doses de 20, 50 ou 100 mg/kg, sobre o número de CFU-GM da medula óssea de animais normais e inoculados com TAE estão apresentados na figura 5 (tabela 4 - apêndice). Em animais normais, a dose de 100 mg/kg aumentou o número de CFU-GM da medula óssea ($P<0,01$, ANOVA, Teste de Tukey) sem produzir alterações no número de colônias esplênicas (figura 6, tabela 5 – apêndice).

Nos animais portadores do TAE, a mielossupressão induzida por este modelo tumoral e expressa através de drástica redução no número de CFU-GM ($P<0,01$, ANOVA, Teste de Tukey), foi restaurada a valores normais após tratamento com as doses de 20 e 50 mg/kg *Withania somnifera* (figura 5, tabela 4 – apêndice). Um maior número de colônias em relação ao controle foi produzido com a dose de 100 mg/kg ($P<0,001$, ANOVA, Teste de Tukey). Em relação a hematopoese extramedular (figura 6, tabela 5 – apêndice), o TAE produz um aumento expressivo no número de CFU-GM do baço, quando comparado ao grupo controle ($P<0,001$, ANOVA, Teste de Tukey). O tratamento destes animais com WS reduziu significativamente o número de colônias esplênicas em todos os grupos avaliados ($P<0,001$, ANOVA, Teste Tukey), Figura 6, tabela 5. Entretanto, a dose de 20 mg/kg do grupo inoculado com TAE produziu uma redução significativa no número de colônias do baço quando comparado ao grupo apenas inoculado com TAE, e produziu aumento significativo no número de colônias quando comparado ao grupo controle ($P<0,001$, ANOVA, Teste de Tukey).

Além disso, nos animais inoculados com TAE e tratados com 100 mg/kg de WS, o aspecto das colônias produzidas é similar às colônias produzidas por animais normais, com núcleo denso e maiores (figura 7).

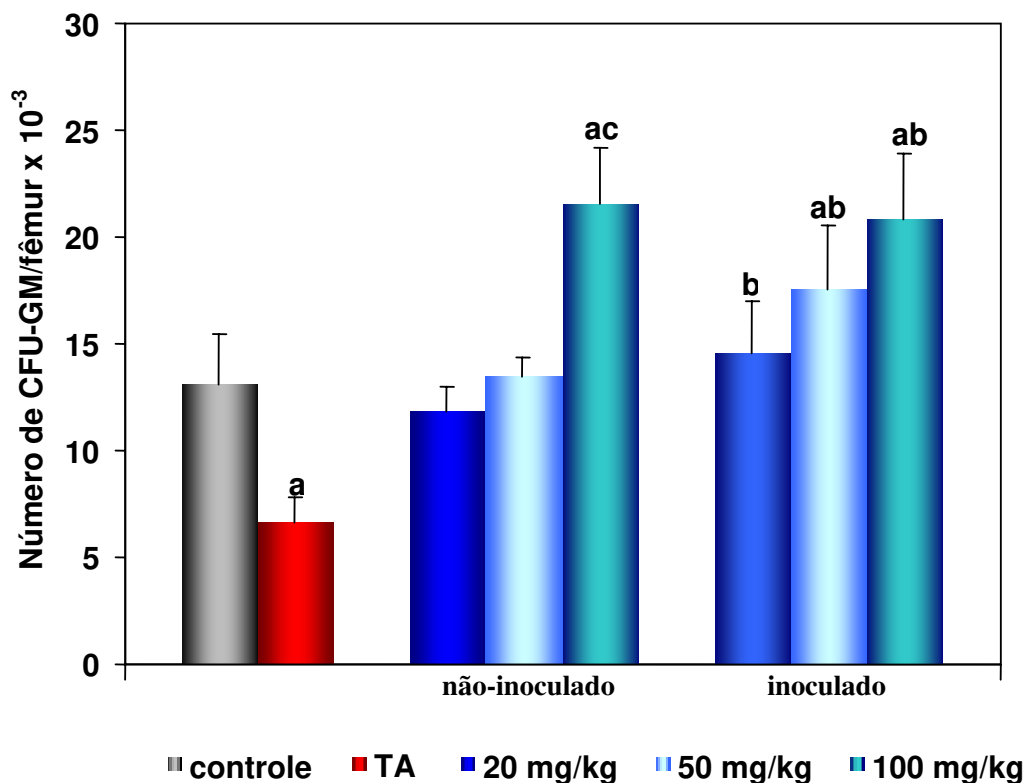


Figura 5-Unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste de Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE; ^c $P < 0,001$ comparado aos grupos tratados com as dose de 20 e 50 mg/kg.

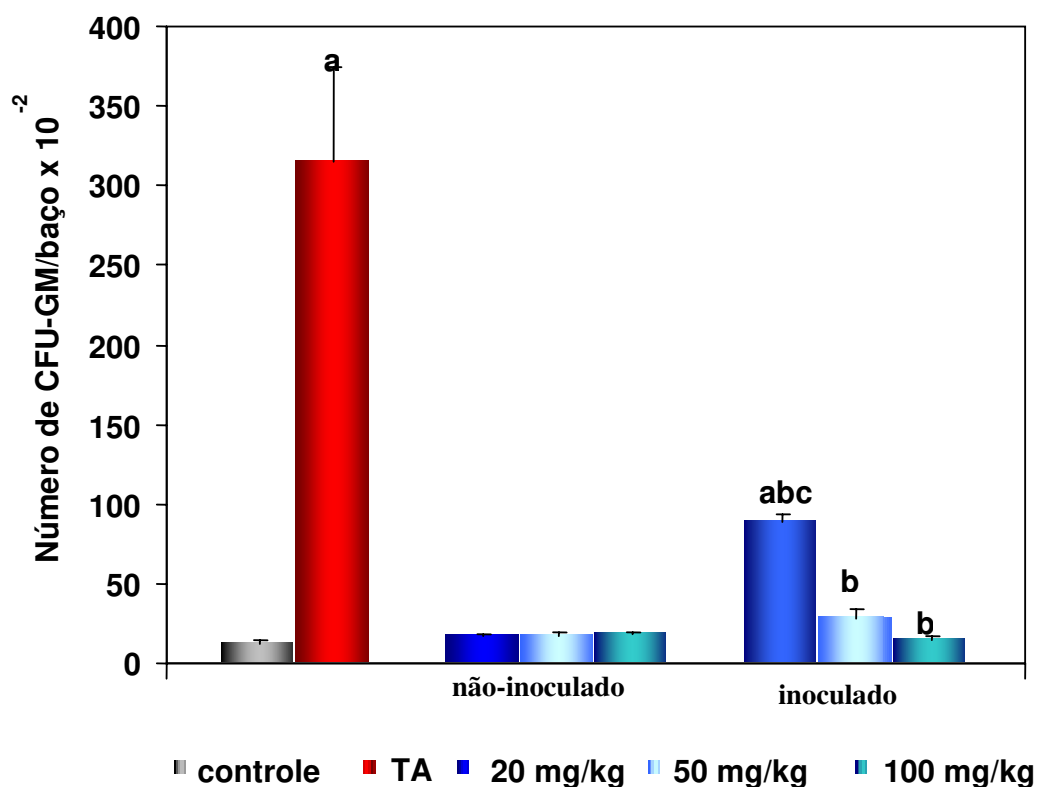


Figura 6-Unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) do baço de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste de Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE; ^c $P < 0,001$ comparado aos grupos tratados com as doses de 50 e 100 mg/kg.

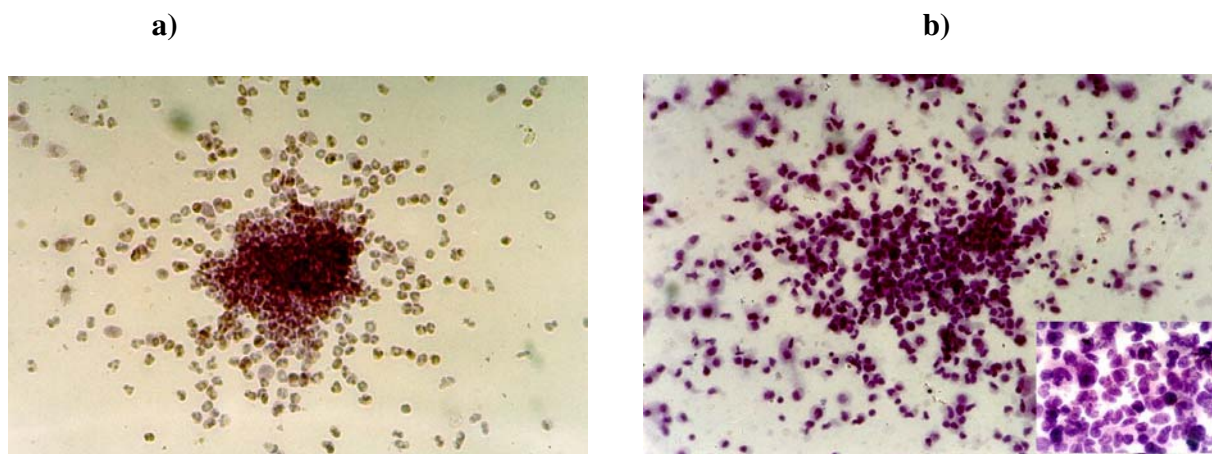


Figura 7-Fotomicrografia de uma colônia de CFU-GM (a) de animal portador do TAE e tratado com 100 mg/Kg de WS, por 10 dias consecutivos e (b) de animal portador do TAE tratado com diluente da droga, por 10 dias consecutivos. As colônias foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) e coradas com Luxol Fast Blue/hematoxilina. Aumento de 20X.

4.2-EFEITO DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* SOBRE A PRODUÇÃO DE FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS (CSFS)

A avaliação da presença de fatores estimuladores de colônias (CSFs) no soro de animais normais apresentou pequena atividade estimuladora de colônias (figura 8, tabela 6 - apêndice). Já, o tratamento com diferentes doses (20, 50 e 100 mg/kg) do extrato de WS produziu um aumento nestes fatores, uma vez que a concentração dos mesmos aumentou significativamente em relação aos animais normais ($P < 0,001$ – ANOVA, Teste de Tukey). Este aumento na concentração de fatores estimuladores de colônias em relação ao grupo controle foi ainda mais evidente no grupo de animais apenas inoculados com TAE ($P < 0,001$ – ANOVA, Teste de Tukey). Nos grupos inoculados com TAE e tratados com as 3 doses (20, 50 e 100 mg/kg) de WS a produção de fatores estimuladores de colônias foi similar ao grupo apenas inoculado com TAE ($P < 0,001$ – ANOVA, Teste de Tukey).

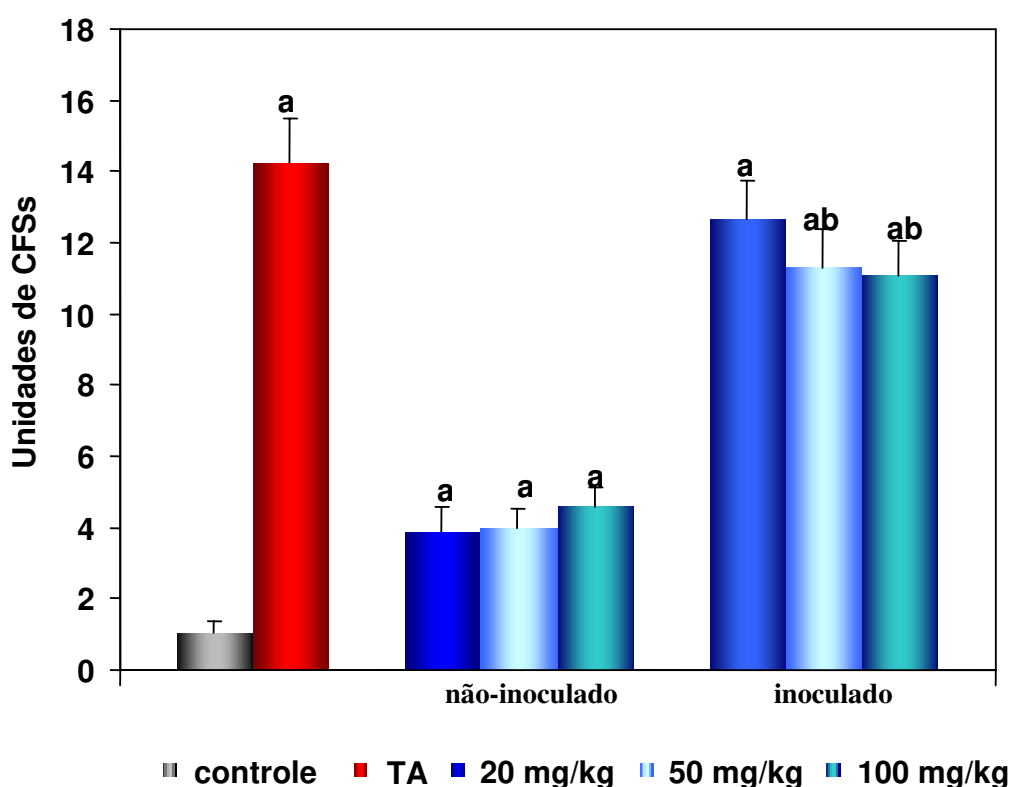


Figura 8-Efeitos do soro de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos diretamente sobre a cultura de células progenitoras da medula óssea de animais normais. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste de Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

4.3-EFEITOS *IN VITRO* DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* SOBRE O CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS DE GRANULÓCITOS-MACRÓFAGOS DA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS NORMAIS

Nenhuma alteração foi observada no crescimento de colônias após incubação de células progenitoras normais da medula óssea com 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de WS, na ausência ou presença do rmGM-CSF (tabela 2).

Tabela 2-Efeitos *in vitro* do extrato de *Withania somnifera* sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos-macrófagos da medula óssea de animais normais

Concentrações	CFU-GM*	
	<i>Withania somnifera</i>	<i>Withania somnifera</i> + 0,5 ng/mL de rmGM-CSF
12,5 µg/mL	02±2,0	99±4,0
25 µg/mL	02±2,0	99±4,0
50 µg/mL	03±1,0	100±3,0
100 µg/mL	04±1,0	100±3,0
200 µg/mL	04±1,0	102±2,0
Controle ⁺	04±2,0	
rmGM-CSF	89±2,0	
Controle [#]		

Unidades formadoras de colônias de granulócitos-macrófagos incubadas com diferentes concentrações do extrato de *Withania somnifera*, na ausência ou presença de 0, 5 ng/mL de rmGM-CSF (volume final de 0,1 mL). As soluções de WS foram preparadas em solução salina/DMSO 0,1%.

*Médias das colônias contadas±desvio padrão de três experimentos.

+Médias dos controles que receberam um volume igual de diluente.

#Médias dos controles que receberam 0,5 ng/mL de rmGM-CSF.

4.4-PESO DO BAÇO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA*

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 9 (tabela 7 -apêndice).

O peso dos baços dos animais apenas tratados com 20, 50 e 100 mg/kg de WS não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (P<0,001 – ANOVA, Teste de Tukey).

No grupo apenas inoculado com TAE observou-se um aumento significativo no peso do órgão em relação ao controle ($P<0,001$ – ANOVA, Teste de Tukey). Entretanto, quando os animais foram tratados com as doses de 20, 50 e 100 mg/kg, houve uma redução no peso do baço, atingindo pesos similares aos dos controles.

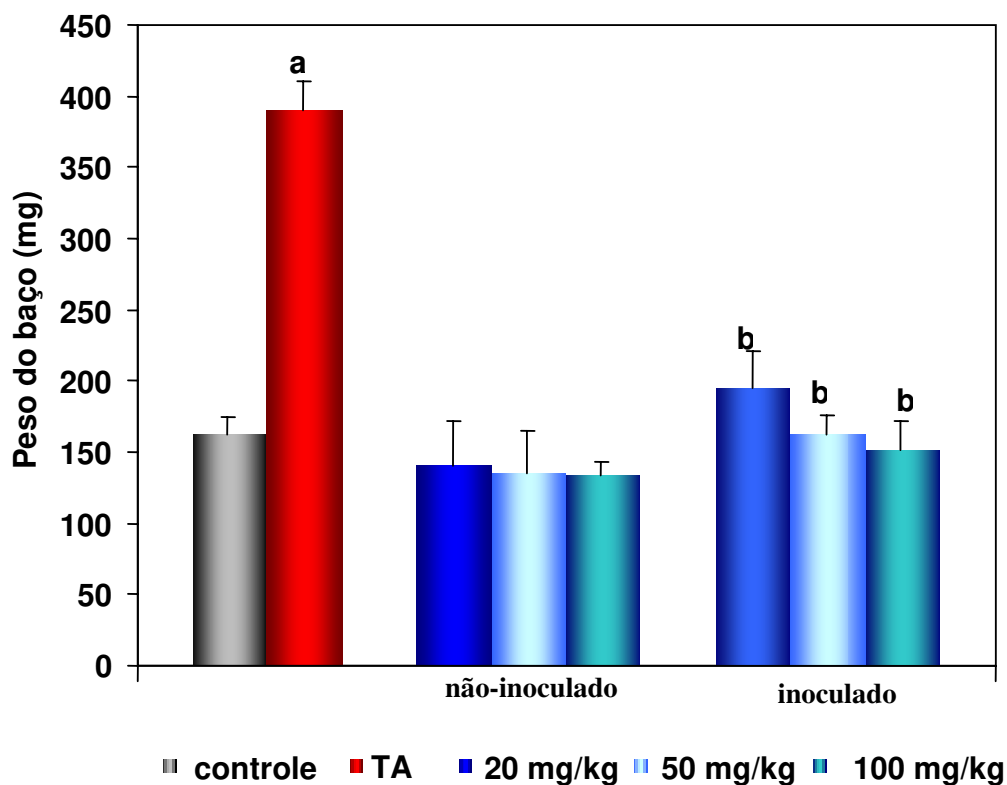


Figura 9-Peso do baço de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste de Tukey. ^a $P<0,001$ comparado ao controle; ^b $P<0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

4.5-EFEITOS DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* SOBRE A RESPOSTA PROLIFERATIVA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

Os efeitos da administração de 20, 50 e 100 mg/kg de WS por 10 dias consecutivos na transformação blástica de linfócitos provenientes do baço de animais inoculados com TAE estão apresentados na figura 10 (tabela 8 – apêndice). Uma inibição estatisticamente significativa ($P < 0,001$ – ANOVA – Teste de Tukey) na resposta proliferativa das células esplênicas à concanavalina A ($5\mu\text{g/mL}$) foi obtida para os animais portadores de tumor. Entretanto, uma reversão deste efeito foi observada nos animais tratados com 50 e 100 mg/Kg de WS, cuja resposta ao estímulo foi maior que aquela observada em camundongos normais na dose de 100 mg/kg. Por outro lado, neste ensaio não foram observadas diferenças na atividade funcional de linfócitos provenientes de camundongos normais tratados com a dose de 20 mg/kg do extrato da planta (Figura 10, tabela 8 - apêndice). Os animais inoculados com TAE e tratados com as doses de 50 e 100 mg/kg de WS apresentaram um aumento significativo na proliferação destas células, quando comparados ao grupo apenas inoculado com TAE ($P < 0,001$ – ANOVA – Teste de Tukey).

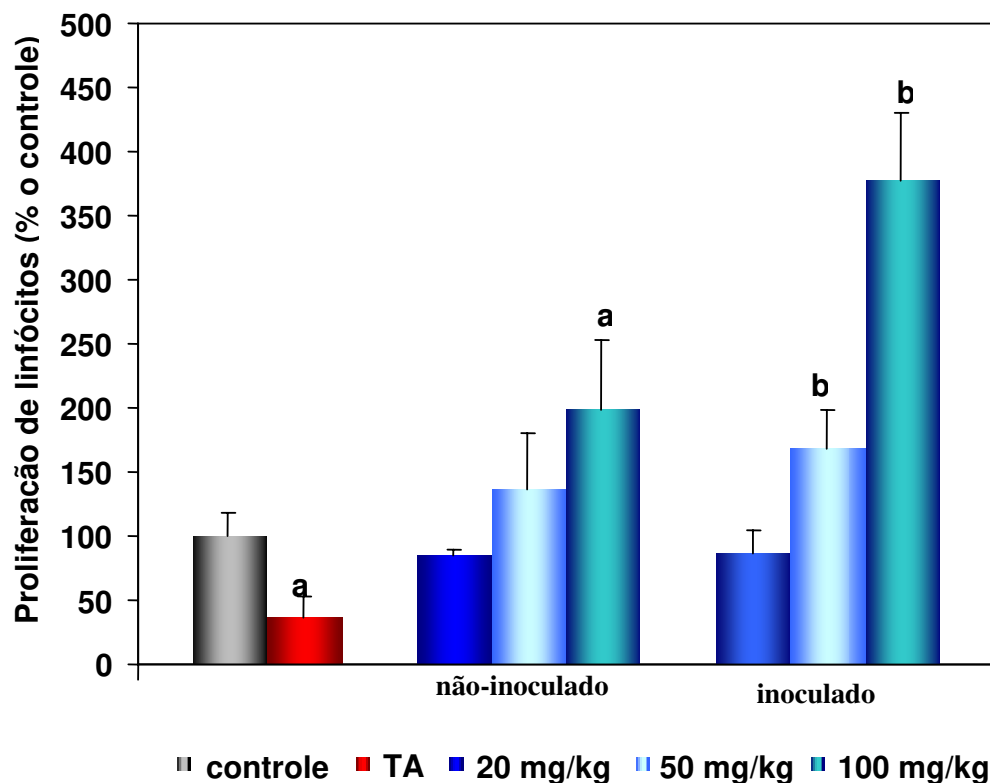


Figura 10-Resposta proliferativa das células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste de Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao inoculado com TAE.

4.6-EFEITOS DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* SOBRE OS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ E TNF- α

A produção de citocinas foi avaliada em animais inoculados e/ou tratados com diferentes doses do extrato de WS (20, 50 ou 100 mg/kg) por 10 dias. As avaliações foram realizadas no sobrenadante de culturas de células esplênicas estimuladas com ConA por 24 e 48 horas. Os resultados estão representados na figura 11-20 (tabelas 9-18 - apêndice).

A avaliação dos níveis de IL-1 (figuras 11 e 12, tabelas 9 e 10 - apêndice) revelou que a administração das 3 doses por 10 dias consecutivos em animais normais produziu um aumento significativo nos níveis de secreção desta citocina 24 e 48 horas após a incubação das células esplênicas. Nos animais inoculados com TAE nenhuma alteração nos níveis de IL-1 foi observada em relação ao grupo controle. No entanto, o tratamento desses animais com as doses de 50 e 100 mg/kg de WS aumentou a produção desta citocina nos dois períodos de incubação das células esplênicas (24 e 48 horas).

Os resultados obtidos para a produção de IL-6 (figuras 13 e 14, tabelas 11 e 12 - apêndice) demonstraram haver uma redução significativa na secreção desta citocina após inoculação do TAE no período de 24 horas de incubação. Níveis basais foram detectados após 48 horas de incubação dessas células. Todavia, níveis estatisticamente mais elevados de IL-6 em relação aos níveis observados em animais somente inoculados com TAE foram determinados no sobrenadante de células provenientes de camundongos com tumor e tratados com todas as doses de WS (20, 50 e 100 mg/kg) em ambos os períodos estudados. Este mesmo efeito foi observado para animais normais tratados com 50 e 100 mg/kg de WS, enquanto a dose de 20 mg/kg não produziu nenhuma alteração neste parâmetro.

Os níveis da citocina TNF- α no sobrenadante das culturas de células provenientes de animais apenas inoculados com TAE não foram alterados nas 24 horas, enquanto que no período de 48 horas houve uma redução significativa em relação ao grupo controle ($P < 0,001$ – ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon) (figuras 15 e 16, tabelas 13 e 14 – apêndice). Os níveis de TNF- α nos animais tratados com a dose de 100 mg/kg apresentaram-se elevados em relação ao controle 24 horas após a incubação das células, enquanto as doses de 20 e 50 mg/kg não apresentaram alteração. Da mesma forma, em 48 horas pudemos observar níveis elevados desta citocina com as doses de 20,

50 e 100 mg/kg. O sobrenadante de animais inoculados com TAE e tratados com a dose de 100 mg/kg de WS, coletado após 24 horas de cultura, apresentou um aumento significativo desta citocina em relação aos grupos controle e apenas inoculado com tumor. No entanto, 48 horas após incubação, todos os grupos inoculados com TAE e tratados com as 3 doses de WS revelaram um aumento de TNF- α em relação ao grupo apenas inoculado (figuras 15 e 16, tabelas 13 e 14 – apêndice).

Um aumento pronunciado ($P < 0,001$) nos níveis de IL-10 foi observado nos animais inoculados com TAE em 24 e 48 horas de incubação (figuras 17 e 18, tabelas 15 e 16 - apêndice). Nenhuma alteração foi observada nos animais tratados com as 3 doses de WS (20, 50 e 100 mg/kg). Por outro lado, 24 horas após a incubação, observou-se uma redução significativa ($P < 0,001$) na produção desta citocina nas 3 doses de WS. Em 48 horas, observou-se que nos animais inoculados com TAE, as doses de 20 e 100 mg/kg demonstraram redução do nível de IL-10 em comparação ao grupo apenas inoculado.

Em relação aos níveis de IFN- γ , observamos uma redução significativa nos níveis desta citocina nos animais apenas inoculados com TAE em 24 e 48 horas de incubação. Houve uma reversão deste quadro quando os animais foram tratados com as doses de 20, 50 e 100 mg/kg, nos períodos de 24 e 48 horas (figuras 19 e 20, tabelas 17 e 18 - apêndice). Nos animais não inoculados e tratados com 20 e 50 mg/kg, 24 horas, observou-se uma redução no nível desta citocina, enquanto um aumento no nível dessa citocina com 100 mg/kg foi detectado. Já em 48 horas, nenhuma alteração foi observada nos animais tratados com as 3 doses da planta.

Sumariamente, podemos concluir que a dose de 100 mg/kg de WS promove um aumento dos níveis de produção da citocina IFN- γ e das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α , reduzindo o nível de IL-10, mostrando-se efetiva nos dois períodos (24 e 48 horas) de incubação das células esplênicas.

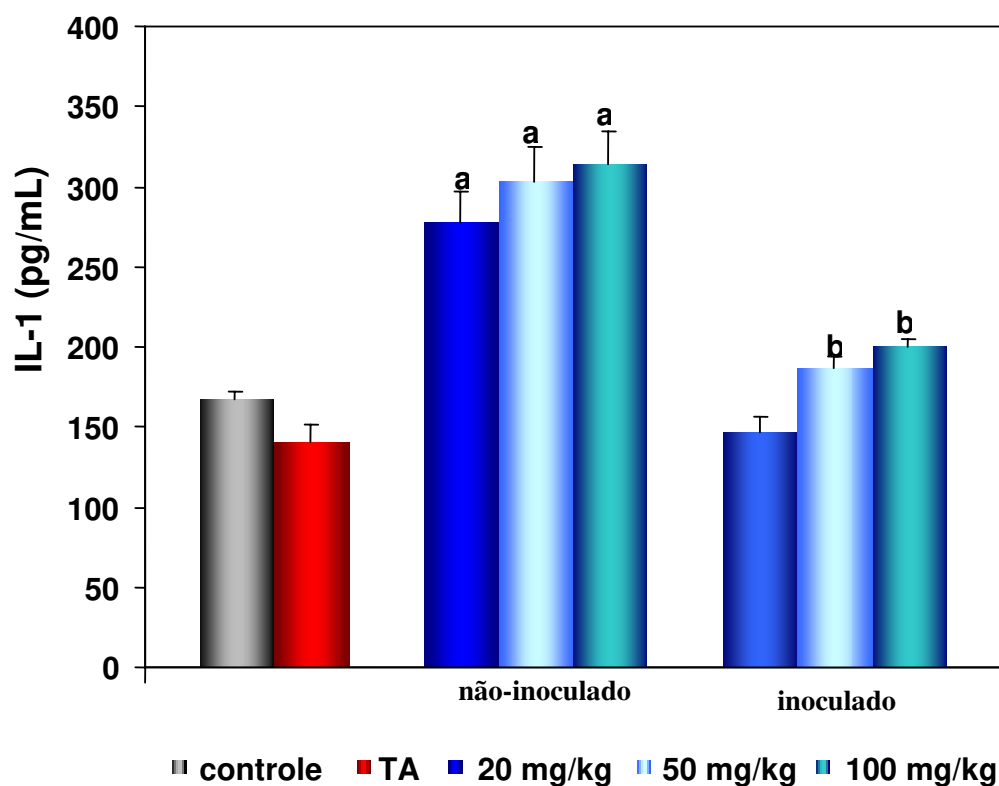


Figura 11-Concentração de IL-1 determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

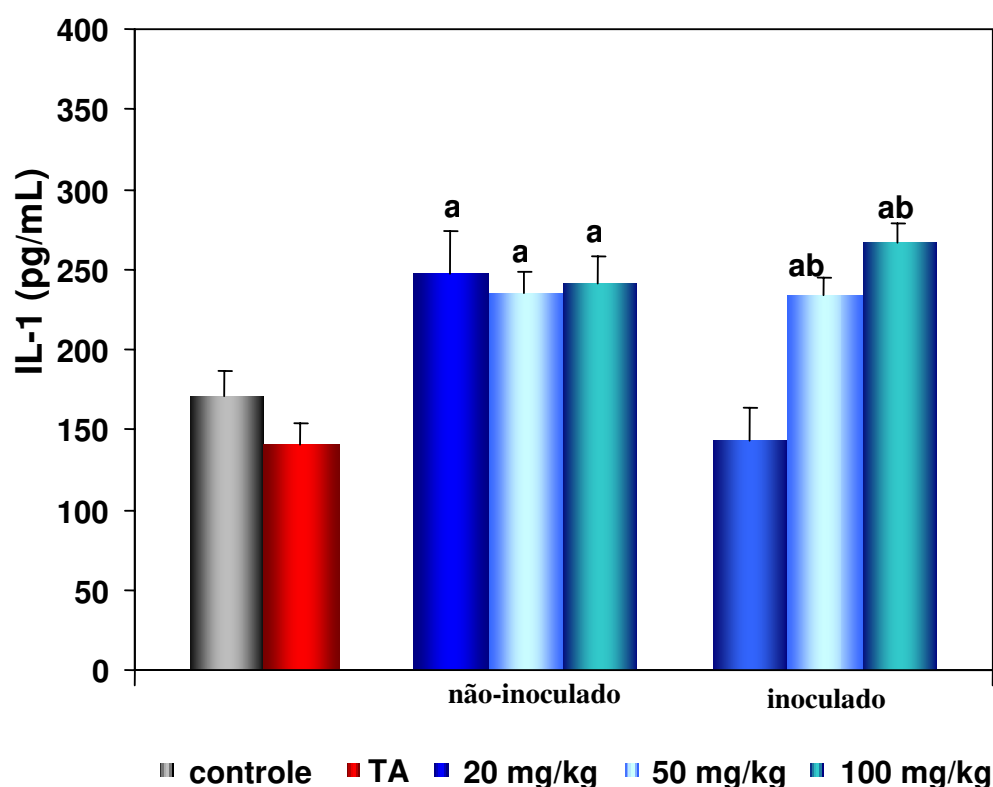


Figura 12-Concentração de IL-1 determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

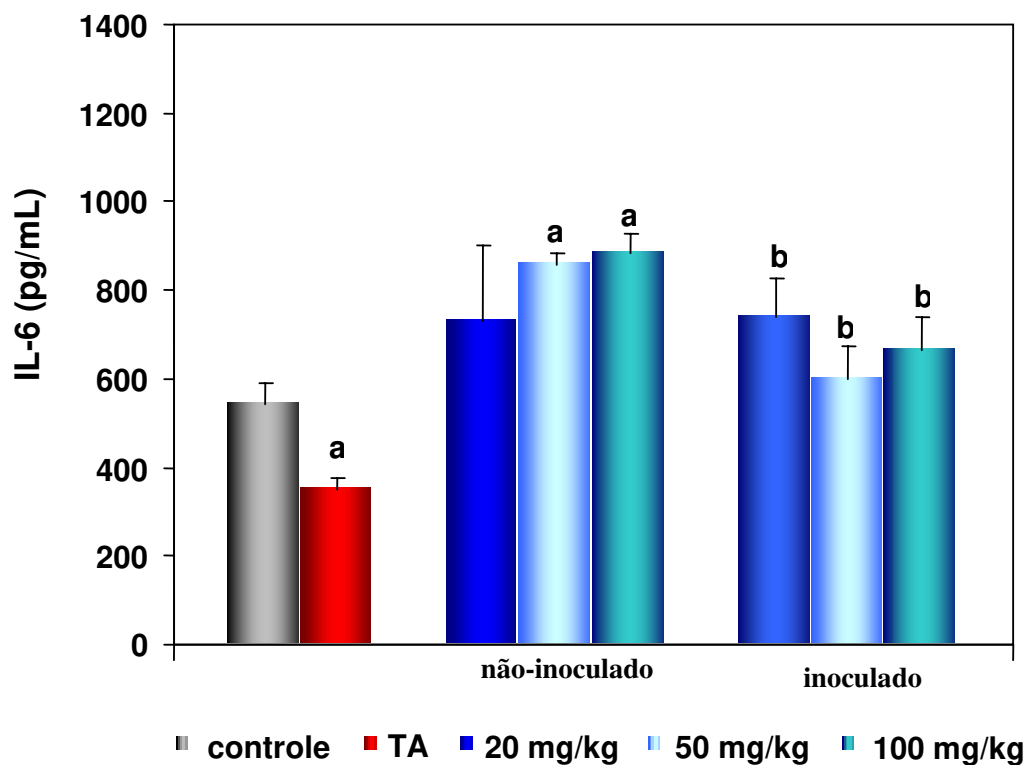


Figura 13-Concentração de IL-6 determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon.. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao inoculado com TAE.

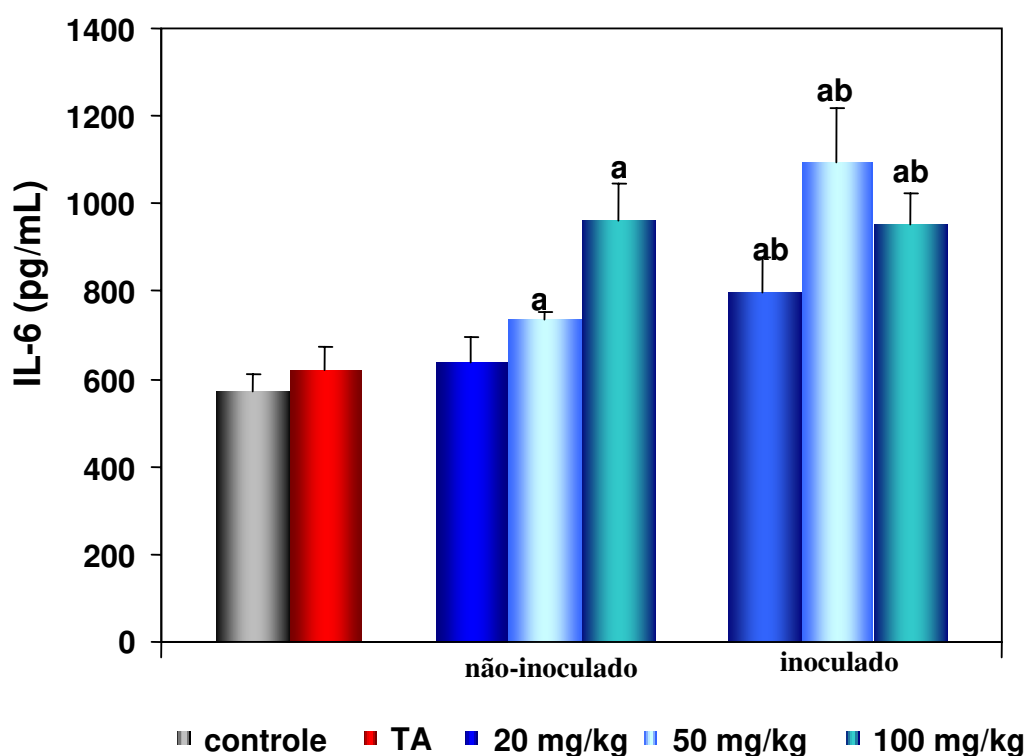


Figura 14-Concentração de IL-6 determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon.. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao inoculado com TAE.

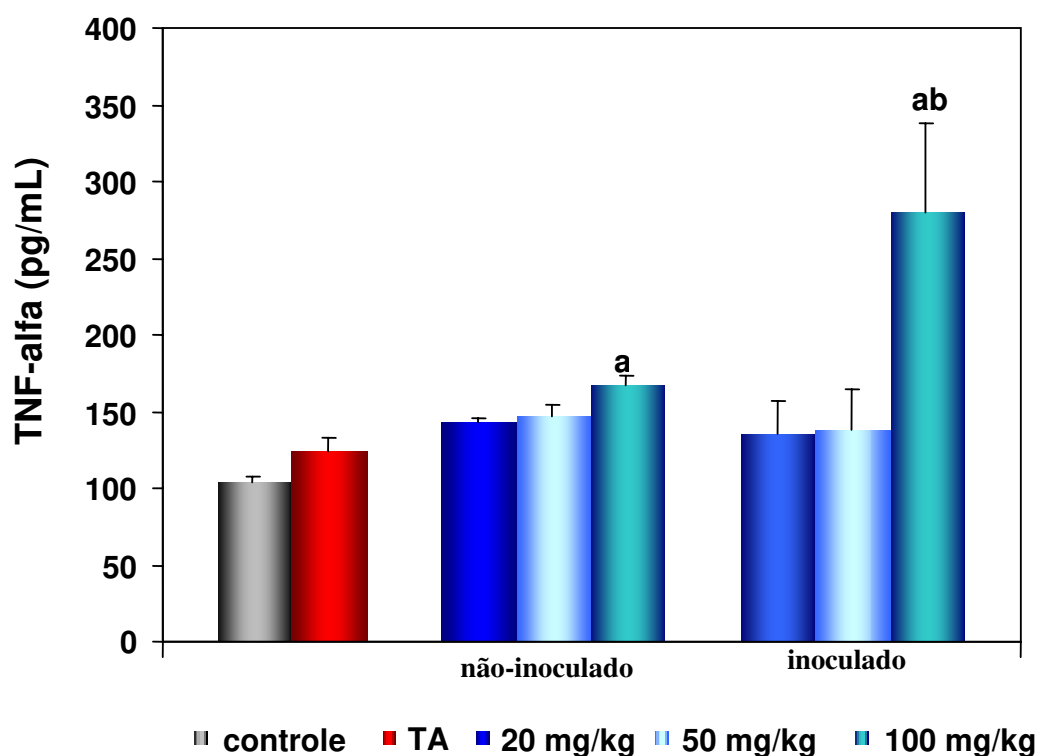


Figura 15-Concentração de TNF- α determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon. ^a $P < 0,01$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

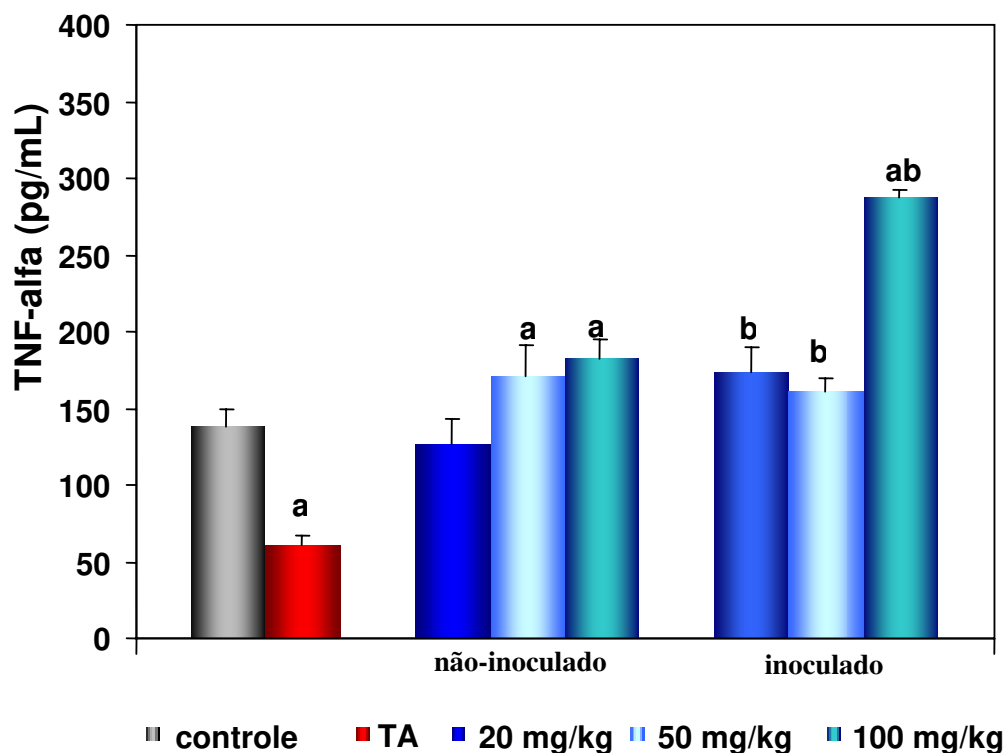


Figura 16-Concentração de TNF- α determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon ^a $P < 0,01$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

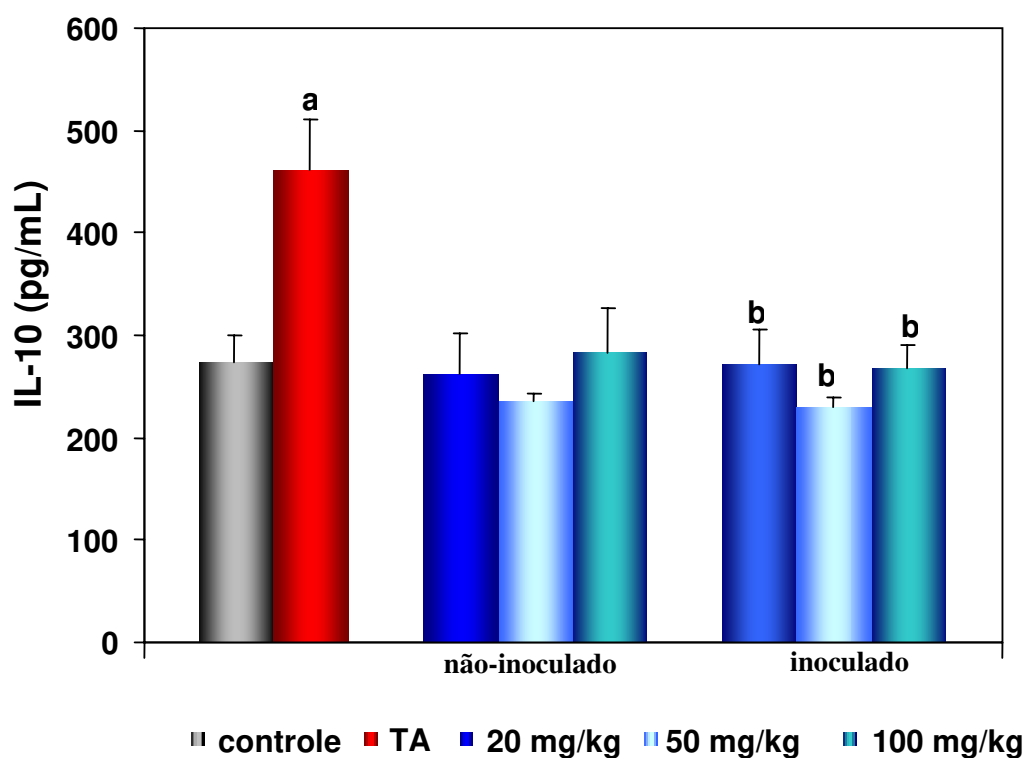


Figura 17-Concentração de IL-10 determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

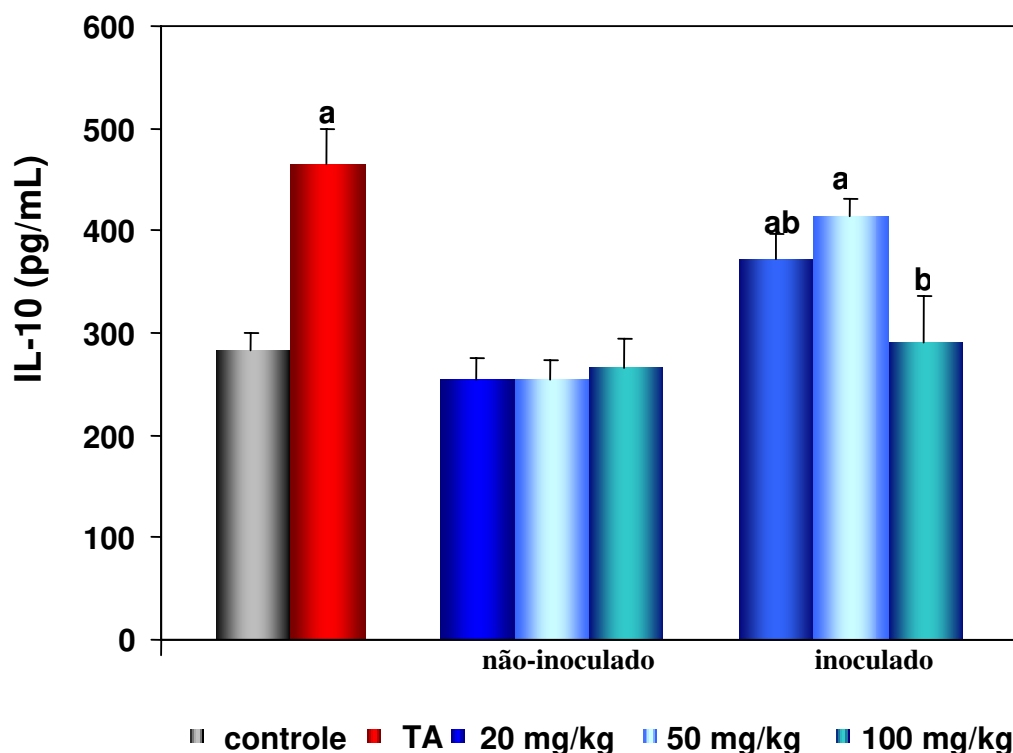


Figura 18-Concentração de IL-10 determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

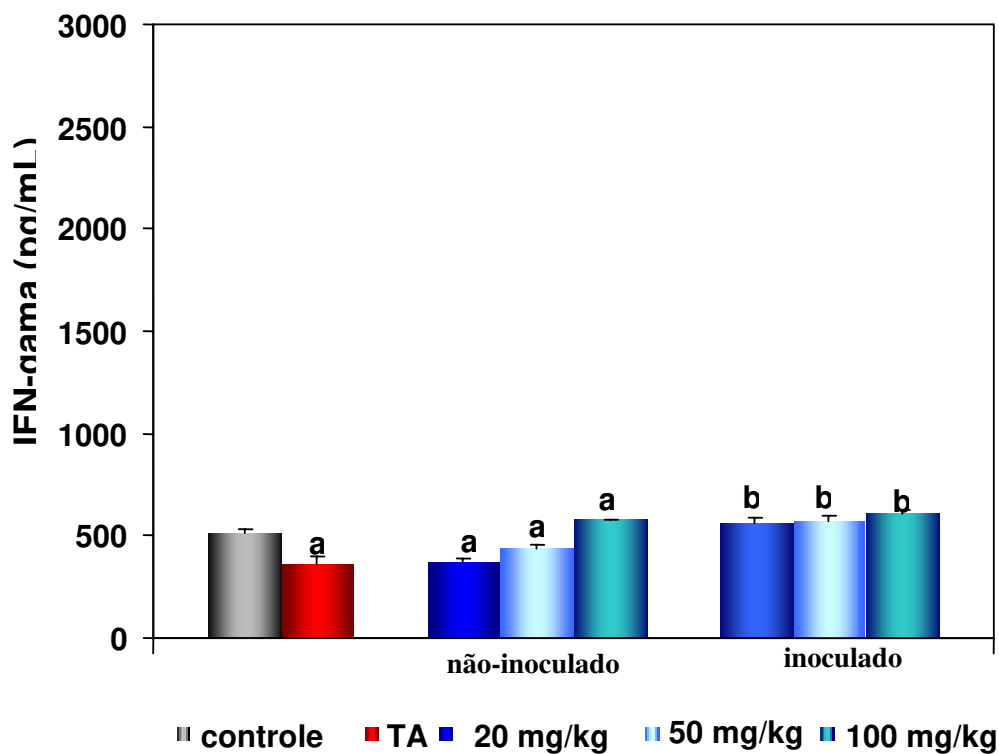


Figura 19-Concentração de INF- γ determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao inoculado com TAE.

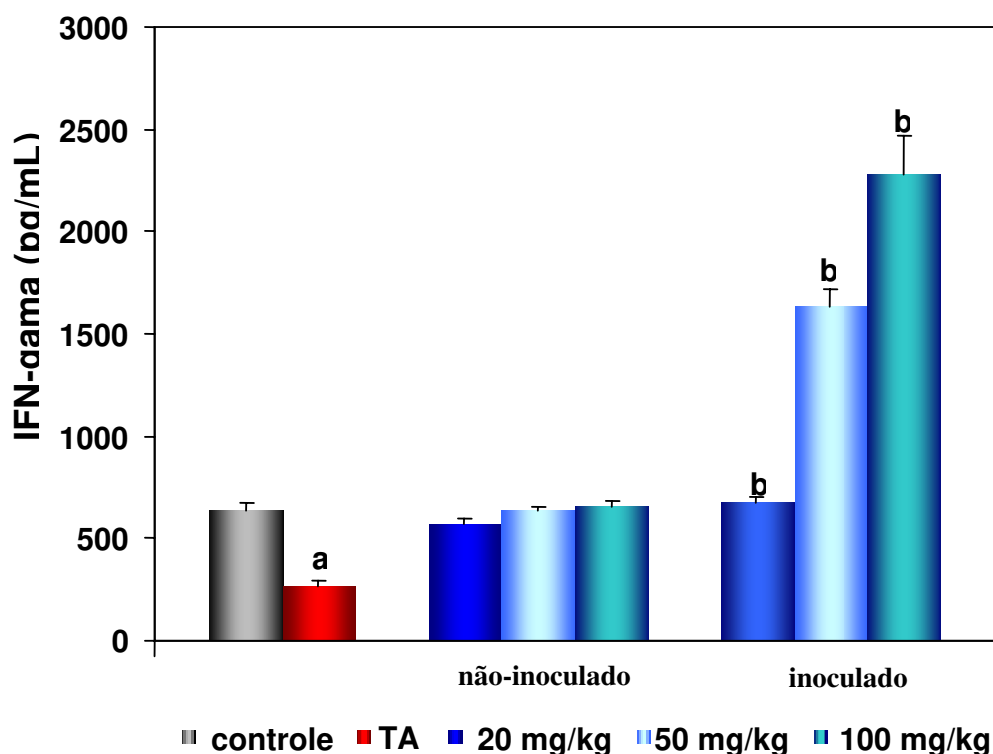


Figura 20-Concentração de INF- γ determinada no sobrenadante de culturas de células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 h após incubação. ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de Wilcoxon. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao inoculado com TAE.

4.7-EFEITOS DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* SOBRE A ATIVIDADE DE CÉLULAS “NATURAL KILLER”

Na figura 21, tabela 20 está apresentada as alterações produzidas na atividade das células NK esplênicas em camundongos, durante o desenvolvimento do TAE. A capacidade citotóxica destas células foi avaliada utilizando-se as células YAC-1 como células alvo e na proporção de 50:1 de células efectoras:células alvo. A atividade encontrada para estas células no 11º dia após a inoculação tumoral foi estatisticamente menor àquela

obtida para animais controles ($P<0,001$). O tratamento destes animais por 10 dias consecutivos com as doses de 50 e 100 mg/kg de WS reverteu a diminuição da atividade destas células, comparado ao grupo inoculado com TAE. A administração do extrato de WS aos animais normais produziu um aumento dose-dependente na atividade funcional destas células, sendo estatisticamente significativo para as dose de 50 e 100 mg/kg de extrato ($P<0,001$).

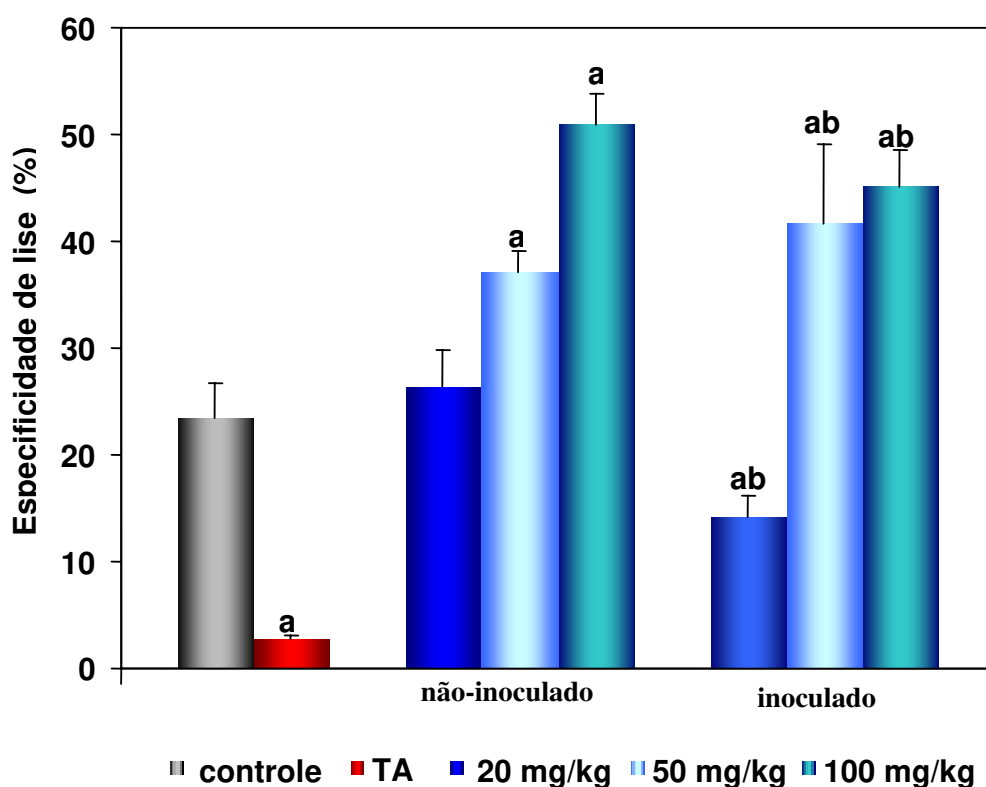


Figura 21-Atividade de células NK em animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste de Tukey. ^a $P<0,001$ comparado ao controle; ^b $P<0,01$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

4.8-EFEITOS DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* SOBRE A FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS DE ERITRÓCITOS (MNPCEs) DA MEDULA ÓSSEA INDUZIDO POR CICLOFOSFAMIDA (CP)

A tabela 3 mostra a frequência de micronúcleos em eritrócitos (MNPCEs) policromáticos de camundongos tratados com diferentes doses do extrato de WS (20, 50 e 100 mg/kg) por 10 dias, e/ou com 200 mg/kg de ciclofosfamida (CP) durante 2 dias consecutivos. CP sozinha induziu um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos ($P < 0,001$ – ANOVA, teste de Chi-quadrado), comparado ao grupo controle negativo (0,9% NaCl). Quando os animais inoculados com CP foram tratados com 20, 50 e 100 mg/kg de extrato de WS, observou-se reduções significativas de 39,30; 59,70 e 70,65%, respectivamente na frequência de micronúcleos de eritrócitos ($P < 0,001$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre a frequência de micronúcleos de eritrócitos da medula óssea de animais apenas tratados com as diferentes doses do extrato e de animais controles (0,9% de NaCl).

Tabela 3-Efeitos do extrato de *Withania somnifera* sobre a frequência de micronúcleos de eritrócitos (MNPCEs) da medula óssea induzido por ciclofosfamida (CP)

Tratamento	N° de céls. analisadas	MNPCEs		Redução (%)
		N°	%	
Controle negativo (0,9%NaCl)	10.000	23	0,23	
Controle positivo (200 mg/Kg CP)	10.000	201	2,01	
<i>Withania somnifera</i>				
20 mg/kg + CP	10.000	122	1,22*	39,30
50 mg/kg + CP	10.000	81	0,81*	59,70
100 mg/kg + CP	10.000	59	0,59*	70,65
<i>Withania somnifera</i>				
20 mg/kg	10.000	30	0,30	
50 mg/kg	10.000	29	0,29	
100 mg/kg	10.000	22	0,22	

* $P < 0,001$ teste Chi-quadrado.

4.9-AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *WITHANIA SOMNIFERA* ATRAVÉS DO MÉTODO DE REDUÇÃO DO TETRAZOLIUM (MTT)

A figura 22 apresenta os resultados da avaliação da citotoxicidade do extrato de WS sobre as linhagens celulares leucêmicas humanas (HL-60, K-562 e MOLT-4). Podemos observar que o extrato de WS foi citotóxico sobre a linhagem HL-60 apenas na concentração de 200 mg/mL. Quanto à linhagem K-562, pudemos observar que o extrato da planta foi efetivo nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/Kg.

Por outro lado, a linhagem leucêmica MOLT-4 mostrou-se mais sensível ao extrato de WS nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 mg/mL. Desta maneira, podemos concluir que a planta possui uma ação direta sobre células tumorais como as testadas nestes estudos.

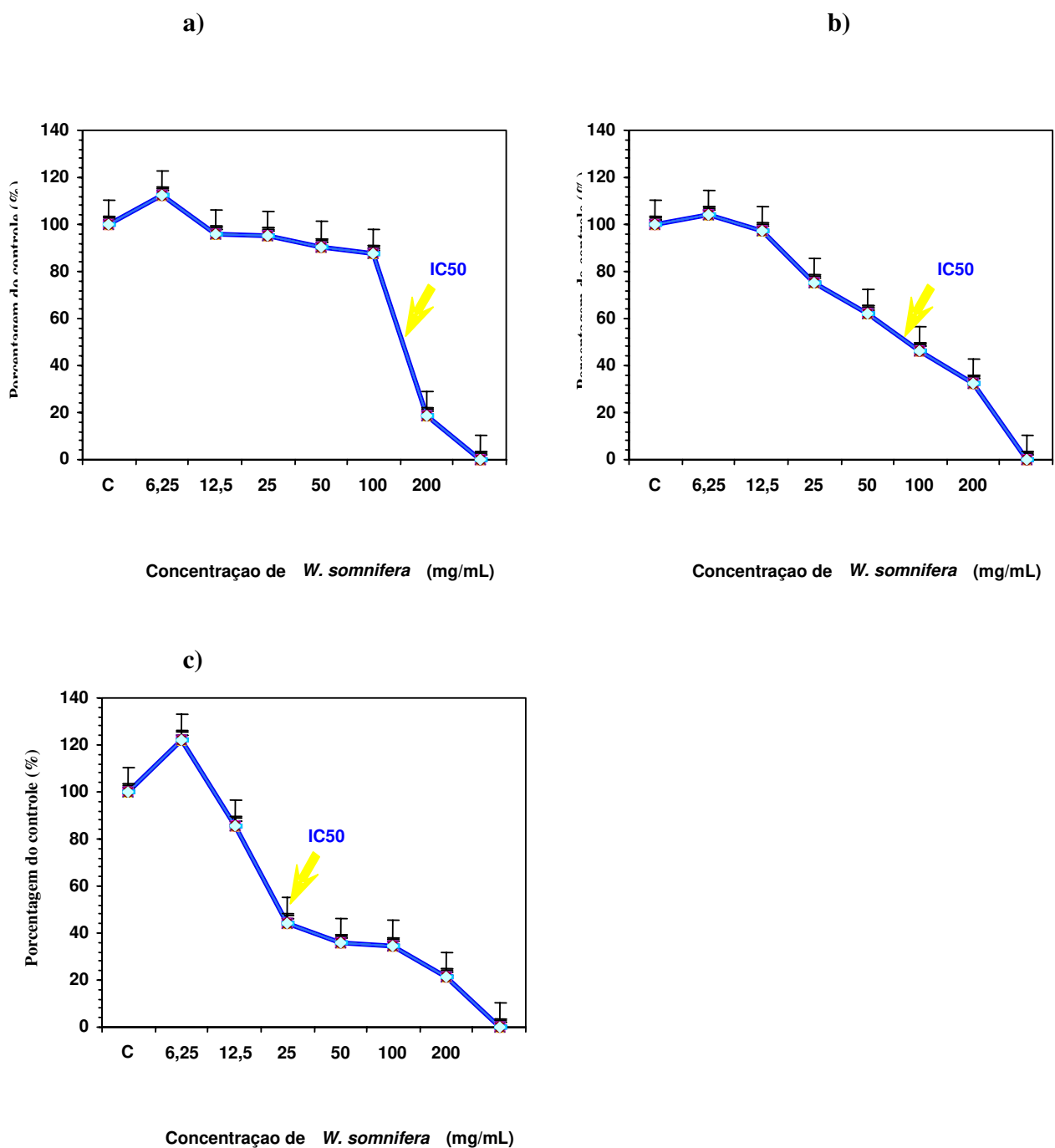


Figura 22-Avaliação da citotoxicidade do extrato de WS nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/mL sobre as linhagens leucêmicas HL-60, K-562 e MOLT-4, **a**, **b** e **c** respectivamente. Os resultados representam as médias das triplicatas e os desvios-padrões.

4.10-SOBREVIDA DE ANIMAIS INOCULADOS COM TAE E TRATADOS COM *WITHANIA SOMNIFERA*

A sobrevida de animais inoculados com TAE e tratados com de 20, 50 ou 100mg/kg do extrato de *Withania somnifera* por 10 dias estão representados na figura 23. Todos os animais portadores de tumor não tratados morreram até o 20º dia de observação, enquanto que, o tratamento com 20, 50 e 100 mg/kg de WS aumentou significativamente ($P<0,01$) a sobrevida destes animais para 30, 35 e 40 dias, respectivamente.

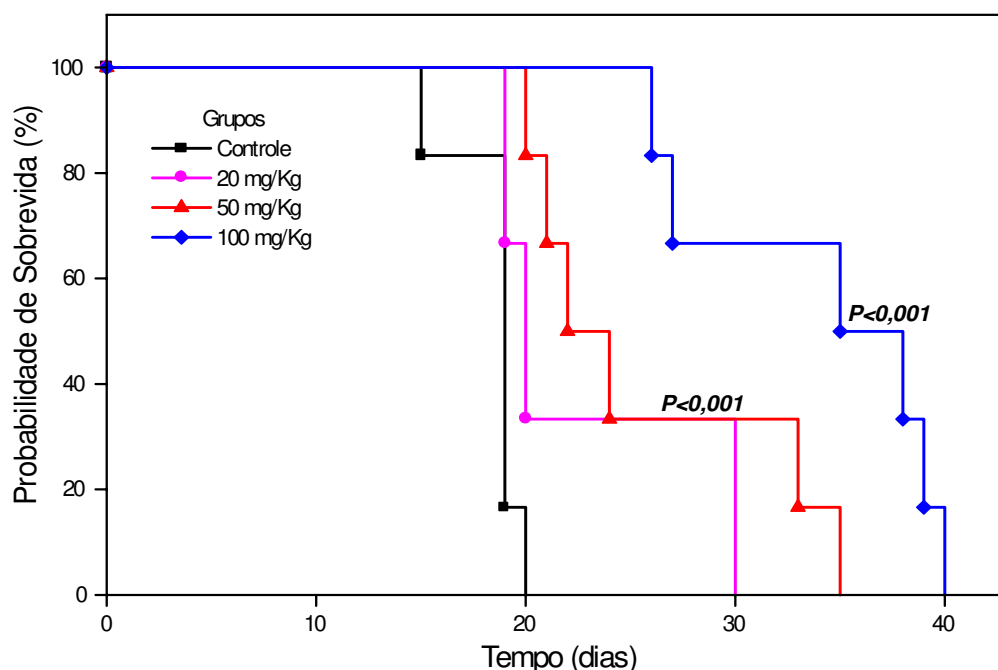


Figura 23-Sobrevida de animais inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com *Withania somnifera*. Os animais foram tratados com doses de 20, 50 e 100 mg/kg por via oral (gavagem), por 10 dias após inoculação intraperitoneal de 6×10^6 células/animal. Os animais controle receberam apenas diluente. Grupos de 24 animais foram observados diariamente durante 30 dias. $P<0,01$, comparado com o grupo portador de tumor (controle) (Kaplan-Meier, Log-rank).

A modulação do sistema imunológico é complexa e envolve a presença de células efectoras e reguladoras, e alterações neste sistema podem resultar em patogênese (Steven *et al.*, 1985; Davis e Kuttan, 2000). A imunossupressão é o principal efeito colateral descrito nas terapias convencionais do câncer, como a radioterapia e quimioterapia. Estudos em nosso laboratório têm demonstrado efeitos imunomoduladores da medula óssea de camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com extratos de diferentes plantas e compostos (*Chlorella vulgaris*, *Pluchea quitoc*, MAPA e titanocenos) (Justo *et al.*, 2000 e 2001; Queiroz *et al.*, 2001; Valadares *et al.*, 2002). Resultados similares foram descritos na literatura com o extrato de *W. somnifera*, uma planta bastante usada na medicina tradicional da Índia e objeto de estudo desta tese, com propriedades antiseratogênicas, adaptogênicas, anticancerígenas, também com efeitos benéficos no tratamento de problemas geriátricos, artrite e estresse (Davis e Kuttan, 2000; Majeed *et al.*, 2000). Estes estudos demonstraram aumento na contagem de células sanguíneas e da medula óssea, aumento da estimulação da atividade fagocitária de macrófagos, indicando atividade estimuladora da planta sobre o sistema hematopoético (Davis e Kuttan, 2000; Majeed *et al.*, 2000).

Neste sentido, no modelo tumoral do tumor ascítico de Ehrlich utilizado nesta tese, nossos resultados confirmaram a inibição no número de células formadoras de colônias do tipo granulócito-macrófago na medula óssea. Entretanto, um efeito mieloprotetor foi observado para o tratamento destes animais com doses de 20, 50 e 100 mg/kg de *Withania somnifera*. Além disso, a dose de 100 mg/kg levou a uma estimulação adicional da mielopoese, acima dos valores normais tratados com esta mesma faixa de doses de *Withania* sem produzir alterações no número de colônias esplênicas. Em relação a hematopoese extramedular, o TAE produziu um aumento expressivo no número de CFU-GM do baço, quando comparado ao grupo controle. O tratamento destes animais com WS reduziu significativamente o número de colônias esplênicas em todos os grupos avaliados, restabelecendo valores normais com as doses de 50 e 100 mg/kg.

Os resultados obtidos referentes aos efeitos produzidos pelo TAE na mielopoese são compatíveis com evidências da literatura que apontam para a capacidade de fatores solúveis, produzidos pelas células tumorais ou pela interação tumor-hospedeiro, de redirecionar a atividade dos macrófagos favorecendo o desenvolvimento tumoral (Pessina

et al., 1982^{a,b}; Sokol e Hudson, 1983; McIntosh e Thomson, 1984; Hardy e Balducci, 1985; McIntosh *et al.*, 1986; Parhar e Lala, 1988; Fecchio *et al.*, 1990; Kobari *et al.*, 1990; Koo *et al.*, 1992; Normann *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1991; Bonta e Ben-Efraim, 1993; Murai *et al.*, 1995; Segura *et al.*, 1997; Elgert *et al.*, 1998). Desta forma, um desequilíbrio nos mecanismos homeostáticos reguladores da mielopoese resultaria principalmente de alterações no compartimento local das células peritoneais. Neste sentido, nossos resultados fornecem evidência adicional à documentada capacidade do TAE de comprometer a geração e competência funcional de macrófagos (Keeb e Lala, 1978; Pessina *et al.*, 1982^{a,b}; Parhar e Lala, 1988; Subiza *et al.*, 1989; Fecchio *et al.*, 1990^a; Segura *et al.*, 1997).

Está bem estabelecido na literatura que células tumorais possuem a habilidade de produzir continuamente fatores estimuladores de colônias (CSFs), assim como receptores para estes CSFs (Subiza *et al.*, 1989). As propriedades fisiológicas dos CSFs de origem tumoral não estão totalmente elucidadas, embora sejam reconhecidos efeitos locais e sistêmicos relacionados à presença destes fatores. Os efeitos sistêmicos incluem uma diminuição na resposta blastogênica de linfócitos T a mitógenos, esplenomegalia associada a hematopoese extramedular (esplênica) e desenvolvimento de células supressoras, as quais pertencem a uma linhagem monocítica indiferenciada ou são macrófagos residentes no baço com capacidade de secretar moléculas imunossupressoras. Em nível local, os CSFs podem agir de forma autócrina promovendo o crescimento tumoral ou reduzindo a tumorigenicidade através de estímulo na resposta imunológica do hospedeiro (Dedhar *et al.*, 1988). Neste sentido, Ruiz de Morales e colaboradores (1999), utilizando duas variantes de células de Ehrlich, uma secretora de fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e de fator estimulador de granulócitos (G-CSF) e uma outra não secretora, demonstraram que as alterações hematopoéticas encontradas neste modelo tumoral não estão restritas à capacidade das células de Ehrlich de produzir GM-CSF e G-CSF. Estes autores sugerem que, embora ocorra produção de CSFs neste modelo tumoral, as quantidades secretadas *in vitro* são insuficientes para reduzir a tumorigenicidade. Os autores sugerem ainda, que a presença de fatores imunossupressores produzidos pelo TAE se contrapõem à resposta imunológica apropriada e, desta forma, antagonizam os efeitos dos CSFs (Ruiz de Morales *et al.*, 1999; Valadares *et al.*, 2002).

Estudos realizados em nosso laboratório e em outros (Keeb e Lala, 1978; Hardy e Balducci, 1985; Valadares et al., 1998; Justo et al., 2000, 2001; Queiroz et al., 2001) demonstraram que, durante o desenvolvimento do TAE ocorre drástica redução no número de CFU-GM, efeito este que concorre para a falência na defesa do hospedeiro. Neste sentido, a reversão destes efeitos após o tratamento com extrato de WS (20, 50 e 100 mg/Kg), foi acompanhada de aumento na sobrevida dos animais portadores de tumor. Portanto, com base no exposto, podemos afirmar que, a capacidade do extrato de WS de induzir recuperação hematopoética constitui um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da eficácia antitumoral desta planta.

A expansão do tumor, associada a uma diminuição no número de CFU-GM da medula óssea e a um progressivo aumento destes precursores no baço, tem sido atribuída principalmente a fatores como migração de células da medula para o baço, depósito de substâncias de origem tumoral no tecido hematopoético, as quais produzem bloqueio funcional dos receptores de macrófagos estromais e de células progenitoras, e mais recentemente, à presença do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o qual, através da modulação da produção de citocinas pelas células endoteliais, aumenta a angiogênese tumoral e atua como promotor de um desequilíbrio hematopoético similar ao ocorrido durante a evolução temporal do TAE (Rahal *et al.*, 1992; Segura *et al.*, 1997; Elgert *et al.*, 1998; Gabrilovich *et al.*, 1998; Ruiz de Morales *et al.*, 1999). Neste sentido, nossas observações quanto à capacidade do extrato de WS reduzir o peso do baço e normalizar o número de CFU-GM neste órgão são particularmente importantes, considerando-se que alterações desta natureza parecem ser um fenômeno universal dos processos malignos.

Evidências apontam para o papel de fatores inibitórios, tais como prostaglandina E₂ (PGE₂) e citocinas produzidas por macrófagos e pelas próprias células tumorais, na mielossupressão observada em animais portadores de tumores (Pessina *et al.*, 1982^b; Bonta e Ben-Efraim, 1993; Hamilton, 1993). Fecchio *et al.* (1990^a) mostraram que a inoculação intraperitoneal de células do TAE produz um aumento na liberação de PGE₂ e um reduzido influxo inflamatório. Este aumento na produção de PGE₂ pelos macrófagos seria responsável também por inibir a proliferação de células T e bloquear a ação estimuladora do TNF- α nos macrófagos (Alleva *et al.*, 1993^{a,b}, Young *et al.*, 1996).

Adicionalmente, foi demonstrado que PGE₂ favorece a secreção de citocinas do tipo Th2 pela inibição das citocinas associadas à subsérie Th1, IL-2 e IFN- γ (Betz e Fox, 1991; Hilkens *et al.*, 1995). Um processo similar foi descrito para citocinas, como o TGF- β e IL-6, produzidas principalmente pelas células tumorais, provocando um declínio a produção de IFN- γ e TNF- α pelos macrófagos (Yamamoto *et al.*, 1995; Elgert *et al.*, 1998; Segura *et al.*, 2000). Além disso, Segura *et al.* (1997) mostraram a presença de TGF- β nas células do TAE, bem como no fluido ascítico dos animais inoculados. Outros autores, como Pessina *et al.* (1982^b) demonstraram que o sistema receptor de células precursoras granulocíticas-macrofágicas, de camundongos portadores do tumor de Ehrlich mostrou-se mais sensível aos fatores presentes no meio condicionado de células tumorais e também, aos fatores inibitórios produzidos pelos macrófagos provenientes de camundongos portadores de tumor. Ademais, o fluido ascítico de Ehrlich provocou uma redução na proliferação e diferenciação de células da medula óssea comprometidas com a série granulocítica (Pessina *et al.*, 1982^b).

Desordens nos processos de maturação de macrófagos, comprometendo a competência funcional destas células, estariam relacionadas à capacidade do hospedeiro de eliminar tumores (Fecchio *et al.*, 1990^{a,b}; Zicari *et al.*, 1992; Bonta e Ben-Efraim, 1993; Barth e Morahan, 1994; Watson e Lopez, 1995). Portanto, é bastante provável que a modulação da mielopoiese proporcionada pelo extrato da *Withania somnifera*, atuando sinergicamente com outros fatores, como citocinas específicas, poderia resultar, em parte, de uma plena ativação dos macrófagos contra as células do TAE, limitando a secreção de moléculas inibitórias pelos macrófagos e, indiretamente, pelas células tumorais. Da mesma forma, uma demanda aumentada por células funcionais na carcinogênese poderia ser compensada pela estimulação causada pela planta na mielopoiese medular. A este respeito, a dose de 100 mg/kg mostrou-se particularmente efetiva, proporcionando acentuada modulação da mielopoiese e uma maior porcentagem de sobrevivência. Em conjunto, estas informações sugerem que a capacidade de modular a mielopoiese pode ter um papel importante na atividade antitumoral do extrato de WS, cujo efeito estaria relacionado ao número de macrófagos disponíveis e à extensão com que suas atividades funcionais são moduladas.

Nossos resultados sobre a inibição da capacidade proliferativa de linfócitos e da atividade de células NK dos animais portadores do TAE corroboram evidências da literatura, que consideram que o declínio na função imunológica do hospedeiro, como uma das principais consequências do crescimento tumoral, é parcialmente explicado por uma diminuição na resposta de linfócitos T e células NK (Ruszala-Mallon *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1992). Esta inibição parece estar relacionada à existência de populações distintas de células supressoras no baço dos animais portadores de tumor, dentre elas as mais estudadas são as células tumorais e os macrófagos e células T supressoras, (Parhar e Lala, 1985; 1988; Tada *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1992; Alleva *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1996; Segura *et al.*, 1997; Elgert *et al.*, 1998). Isto é compatível com a demonstração da presença de uma aumentada população de macrófagos supressores no baço de camundongos portadores de TAE, associada a uma aumentada atividade hematopoética (Parhar e Lala, 1988; Subiza *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1990; Kumagai *et al.*, 1995; Segura *et al.*, 1997). Além disso, o crescimento tumoral estaria associado, também, a um aumento na atividade de células supressoras naturais, cujo fenótipo é distinto daquele observado para monócitos e células T maduras (Subiza *et al.*, 1989; Young e Wright, 1992; Koyama e Fukao, 1994; Watson e Lopez, 1995; Young *et al.*, 1996; Justo *et al.*, 2001).

Em animais portadores do TAE esta imunossupressão seria mediada principalmente por macrófagos (Parhar e Lala, 1985, 1988; Lala *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1990). A este respeito, Segura *et al.* (1997) demonstraram uma diminuição na frequência de linfócitos Th no baço durante o crescimento do TAE. O número total de linfócitos T CD4⁺ expressando IFN- γ não se alterou, enquanto que, o número de macrófagos esplênicos aumentou. Ademais, TGF- β foi detectado nas células do TAE e também no fluido ascítico. Como consequência, uma polarização da resposta Th1/Th2 progressiva ocorre com o desenvolvimento tumoral (Gosh *et al.*, 1995; Segura *et al.*, 1997, 2000).

Estes estudos explicam, em parte, os níveis de IFN- γ observados, em nossos experimentos, nos camundongos portadores do TAE e tratados com WS. Esta citocina exerce efeitos antitumorais, através de mecanismos diretos e indiretos, é produzido principalmente por células NK e linfócitos Th em resposta a um estímulo imunológico (Abbas, 2000). As suas principais propriedades biológicas são indução da produção de

reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio e potente estimulação de macrófagos com aumento de sua atividade microbicida (Whintrout e Varesio, 1991; Stites, 2000). Esta citocina também estimula a transcrição de genes IL-1 e TNF- α e moléculas do MHC de classes I e II, o que amplifica a fase de reconhecimento do antígeno na resposta imunológica (Goldsby, 2000). Além disso, células co-expressando IFN- γ parecem ter um papel na regulação da resposta de células Th1 (Assenmacher *et al.*, 1994).

O IFN- γ também ativa linfócitos T, promovendo sua diferenciação para Th1 e inibindo o perfil Th2. Além de aumentar a citotoxicidade das células NK, ativa as células endoteliais para a adesão de linfócitos T, potencializando o efeito do TNF- α sobre as mesmas (Stites, 2000; Abbas, 2000). O IFN- γ ainda apresenta atividade antiproliferativa direta e propriedades anti-angiogênicas. Entre os tumores humanos, tem sido demonstrada a expressão de altos níveis de IFN- γ em regressões espontâneas primárias de carcinomas de célula basal (Wong *et al.*, 1997) e melanoma (Lowes *et al.*, 1997). Neste sentido, nossos resultados são bastante promissores pois sugerem que o extrato de WS induz uma resposta do tipo Th1, com níveis expressivos de IFN- γ sendo secretados. Notavelmente, IFN- γ é particularmente potente para induzir a atividade tumoricida de macrófagos (Yamamoto *et al.*, 1995), além de atuar em conjunto com TNF- α para reduzir a atividade de células supressoras naturais, restaurar a função de células T e células NK, induzir a diferenciação mielóide, reduzir a produção de TGF- β e aumentar a produção de TNF- α (Geissler *et al.*, 1989; Ruhl e Pluznik, 1993; Samal *et al.*, 1993; Pak *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1997).

Segundo Smyth *et al.* (1998), TNF- α tem um papel fundamental na rejeição de tumores mediada por células NK no peritônio. A este respeito, Fung *et al.* (1985, 1995) demonstraram inibição do crescimento das células ascíticas do tumor de Ehrlich *in vitro* e *in vivo* utilizando-se o tratamento com TNF- α . Estes dados corroboram com nossos resultados, onde observamos um aumento dos níveis desta citocina nos animais portadores do TAE e tratados com 100 mg/kg de *Withania somnifera*.

Quanto à interleucina 10, que é uma potente citocina imunossupressora, produzida por linfócitos T, macrófagos, queratinócitos e linfócitos B, notamos em nossos experimentos, uma regulação na produção desta citocina nos animais tratados com WS.

Esta citocina apresenta como principais atividades biológicas a supressão da atividade de macrófagos, inibição de citocinas pró-inflamatórias e indução de proliferação de linfócitos B e secreção de imunoglobulinas (Liles e Van Voorhis, 1995; Abbas, 2000). Alguns autores têm demonstrado que a citocina IL-10 é produzida por uma variedade de tumores sólidos, favorecendo o desenvolvimento tumoral (Tetsuhiro *et al.*, 1999). Apesar desta citocina ter sido associada com inibição do crescimento de melanoma murino (Walos *et al.*, 1999), a proliferação de várias linhagens de células de melanoma humano foi aumentada por IL-10 exógena, sugerindo que esta citocina age como um mecanismo de escape tumoral (Sato *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 1997). Estes estudos em conjunto são particularmente interessantes ao se considerar o papel destas citocinas em animais portadores do TAE. Camundongos portadores do TAE apresentam um aumento na produção de IL-10, supressora, e menor resistência ao desenvolvimento tumoral, que então foi controlado com a administração do extrato de WS.

As funções da IL-6 incluem a estimulação da proliferação de linfócitos, aumento da atividade de células NK, alterações no recrutamento e migração de leucócitos, aumento das proteínas da fase aguda pelos hepatócitos, além da estimulação da hematopoese (Akira *et al.*, 1990). A IL-6 é a principal citocina presente no soro de camundongos portadores de infecção, por exemplo, sendo os monócitos e macrófagos considerados as principais fontes desta citocina nos estágios iniciais da infecção (Liu e Cheers, 1993). Experimentos utilizando-se anticorpos monoclonais anti-IL-6 indicaram que o efeito protetor da IL-1 é dependente da presença de IL-6. Além disso, cooperação entre IL-6 e TNF- α também parece ser fundamental para a resistência dos animais (Liu *et al.*, 1995). Outro aspecto importante é a capacidade desta citocina de acelerar a produção *in vitro* de IFN- γ , contribuindo na aquisição de imunidade contra o TAE. Estes fatos sugerem que o aumento nos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α , induzido pela *Withania* desempenha um papel fundamental na resistência dos animais ao tumor, promovendo a ativação de macrófagos, neutrófilos e células NK, além de contribuir na ativação de células T.

Além disso, nossos resultados sobre a citotoxicidade do extrato de WS sobre as linhagens leucêmicas HL-60, K-562 e MOLT-4 confirmaram o potencial antitumoral desta planta. Pudemos verificar que houve citotoxicidade do extrato de WS sobre estas linhagens.

O enfoque convencional para o tratamento de leucemia aguda tem sido a quimioterapia, o qual é citotóxico para clones malignos, e é também citodestrutivo para as células normais. Além disso, algumas células leucêmicas desenvolvem resistência a quimioterapia e são então, difíceis de serem erradicadas. Terapias alternativas, associadas com efeitos colaterais mínimos, têm sido testadas como uma modalidade de tratamento em leucemias (Sachs, 1996). Muitos compostos incluindo dimetilsulfóxido, ácido retinóico, entre outros, são citotóxicos para linhagens leucêmicas de células maduras. Desta forma, nossos dados corroboram com a literatura, apontando a *Withania somnifera* como uma alternativa no tratamento de leucemias agudas. Ademais, dados da literatura, indicaram que a administração do extrato desta planta reduziu significativamente a leucopenia induzida pelo tratamento com ciclofosfamida em camundongos, indicando que o tratamento com *Withania* poderia reduzir a toxicidade induzida pela ciclofosfamida e portanto, ser utilizada na terapia do câncer (Kuttan e Davis, 1998).

Desta maneira, também pudemos observar em nossos experimentos, que os camundongos que foram tratados com ciclofosfamida e concomitantemente com diferentes doses do extrato de WS, apresentaram uma redução significativa na presença de micronúcleos de eritrócitos induzidos pelo quimioterápico. O teste da presença de micronúcleos de eritrócitos tem sido bastante utilizado para monitorar agentes cancerígenos e com propriedade mutagênicas (Ribeiro *et al.*, 2001). Portanto, a quimioprevenção é uma estratégia usada para reduzir a incidência de cânceres humanos através da inibição da carcinogênese ou através da prevenção à exposição a agentes cancerígenos (Wattenberg, 1985; Sporn, 1993). Muitos compostos constituintes da dieta alimentar possuem influência considerável ou alteram os efeitos adversos de agentes carcinogênicos (Ames, 1983; Fiala *et al.*, 1985; Hayatsu *et al.*, 1988; DeMarini *et al.*, 1998). Entretanto, a atenção à prevenção de doenças relacionadas à mutação tal como o câncer tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores na busca de substâncias que possam inibir a mutagênese ou a carcinogênese produzida por agentes físicos e químicos *in vivo* (Hayatsu, 1988; Ames e Gold, 1997).

Estes resultados possuem uma importância relevante, pois o tratamento com o extrato de *Withania somnifera* tem um reflexo positivo nos processos envolvidos com o restabelecimento de animais portadores do TAE. O reflexo desta pesquisa é particularmente

encorajador ao se considerar possíveis abordagens terapêuticas em combinação com quimioterápicos, para proteger o hospedeiro da hematotoxicidade, bem como para suplementar a eficiência tumoricida.

6- CONCLUSÕES

O presente trabalho nos permitiu concluir que:

- O extrato de *Withania somnifera* possui propriedades hematomoduladoras em paralelo à atividade antitumoral.
- O extrato aumenta a capacidade de proliferação dos linfócitos e a capacidade citotóxica de células NK, reduzidas na presença do TAE.
- A *Withania somnifera* aumenta os níveis de produção da citocina IFN- γ e das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α .
- A planta protege contra a polarização Th2 induzida por este modelo tumoral.
- A *Withania somnifera* apresenta propriedades citotóxicas contra as linhagens celulares HL-60, K-562 e MOLT-4.
- O extrato de WS possui propriedades anti-genotóxicas, reduzindo a presença de micronúcleos de eritrócitos induzida pelo quimioterápico ciclofosfamida.
- O extrato da planta aumenta a sobrevida dos animais inoculados com TAE.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. Cellular and molecular immunology. **4nd ed. W.B. Saunders Company: Philadelphia**, 2000.

Alleva, D. G.; Burger, C. J.; Elgert, K. D. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF- α production. **J. Immunol.**, **153**: 1674, 1994.

Alleva, D.G., Burger, C.J., Elgert, K.D. Interferon- γ reduces tumour-induced Ia⁻ macrophage-mediated suppression - Role of prostaglandin E₂, Ia, and TNF- α . *Immunopharmacology* 25, 215–227, 1993^a.

Alleva, D.G., Burger, C.J., Elgert, K.D. Tumour growth increases Ia⁻ macrophage synthesis of tumour necrosis factor- α and prostaglandin E₂: changes in macrophage suppressor activity. *J. Leukocyte Biol.* 53, 550–558, 1993^b.

Ames, B. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, **221**: 1256-1263, 1983.

Ames, B. N.; Gold, L. S. The causes and prevention of cancer: gaining perspective. **Environ. Health Perspect.**, **105(4)**: 865-8739, 1997.

Assenmacher, M.; Jurgen, S.; Radbruch, A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-4-expressing cells. **Eur. J. Immunol.**, **24**: 1097, 1994.

Atal, C. K.; Gupta, O. P. Pharmacognostical study of *Withania somnifera*. **Report submitted to ICMR New Delhi**, 1968.

Barata, L. Plantas medicinais da Amazônia. **Boletim apresentado à Fundação Brasileira de Plantas Mediciniais**, **9**:1991.

Barth, M. W.; Morahan, P. S. Role of macrophages in the 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**: 108–113, 1991.

Bogdan, C.; Paik, J.; Vodovotz, Y.; Nathan, C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin-10. **J. Biol. Chem.**, **267**:23301, 1992.

- Bonta, I.L., Ben-Efraim, S. Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumour activity. **J. Leukoc. Biol.** **54**: 613-626, 1993.
- Broxmeyer, H. E.; Williams, D. E.; Cooper, S.; Shadduck, R. K.; Gillis, S.; Waheed, A.; Urdal, D. L.; Bicknel, D. C. Comparative effects in vivo of recombinant murine interleukin 3, natural murine colony-stimulating factor-1, and recombinant murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor on myelopoiesis in mice. **J. Clin. Invest.**, **79**: 721, 1987.
- Burgess, A. W.; Metcalf, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood.**, **56**: 947, 1980.
- DeMarini, D. M. Dietary interventions of Human carcinogenesis. **Mut. Res.**, **400**: 457-465, 1998.
- Davis, L.; Kuttan, G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. **J. Ethnopharmacol.**, **71**:193-200, 2000.
- Dhuley, J. N. Effect of some Indian herbs on macrophage functions in ochratoxin A treated mice. **J. Ethnopharmacol.**, **58(1)**: 15-20, 1997.
- Ding, L.; Shevach, E. M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. **J. Immunol.**, **148**: 3133, 1992.
- Duffie, G. P.; Young, M. R. Tumoricidal activity of alveolar and peritoneal macrophages of C57B1/6 mice bearing metastatic or nonmetastatic variants of Lewis lung carcinoma. **J. leukoc. Biol.**, **49**: 8, 1991.
- Ehrlich, P.; Apolant, T. Beobachtungen wiber maligne mausetumoren. **Berliner Klunische Wochenschrift**, **28**: 871, 1905.
- Elexpuru, A., Martin-Nieto, J., Jimenez, A., Gomez, C., Villalobo, A. Ehrlich ascites tumor cells produce a transforming growth factor-beta (TGFβ)-like activity but lack receptors with TGFβ-binding capacity. **Mol. Cell. Biochem.** **170**:153–162, 1997.
- Elgert, K.D., Alleva, D.G., Mullins, D.W. Tumour-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **J. Leukoc. Biol.** **64**: 275-290, 1998.

- Fecchio, D.; Sirois, P.; Russo, M.; Jancar, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumour in mice peritoneal cavity. **Inflammation** **14**: 125–132, 1990.
- Fecchio, D.; Sirois, P.; Russo, M.; Braquet, P.; Jancar, S. Inhibitor of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF antagonists. **Int. J. Immunopharmacol.**, **12**: 57, 1990^b.
- Fecchio, D.; Sirois, P.; Russo, M.; Jancar, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation.**, **14**: 125, 1990^a
- Fiala, E. S.; Reddy, B. S.; Weisburger, J. H. Naturally occurring anticarcinogenic substances in foodstuffs. **Annu. Vet. Nutr.**, **5**: 295-321, 1985.
- Fisher D.C., Peters W.P. Advances in the clinical use of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to intensify cancer chemotherapy. **Curr Opin Hematol.****1**(3):221-227, 1994.
- Froquet R., Sibiril Y., Parent-Massin D. Improvement of megakaryocytic progenitor culture for toxicological investigations. **Toxicology in Vitro.** **15** : 691-699, 2001.
- Fung, K. P.; Lam, W. P.; Choy, Y. M.; Lee, C. Y. Human tumour necrosis factor- α inhibits glucose transport in cultured Ehrlich ascites tumour cells. **Life Sci.**, **57**: PL1, 1995.
- Fung, K. P.; Leung, S. W.; Há, D. K.; Ng, S. W.; Choy, Y. M.; Lee, C. Y. Effect of tumor necrosis factor on growth of Ehrlich ascites tumour cells in vitro and in vivo. **Cancer Lett.**, **27**: 269, 1985.
- Gabrilovich, D.; Ishida, T.; Oyama, T.; Ran, S.; Kravtsov, V.; Nadaf, S.; Carbone, D. P. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vitro. **Blood**, **11**: 4150, 1998.
- Geissler, K.; Tricot, G.; Leemhuis, T.; Walker, E.; Broxmeyer, H. E. Differentiation-inducing effect of recombinant human tumor necrosis factor α and γ -interferon in vitro on blast cells from patients with acute myeloid leukemia and myeloid blast crisis of chronic myeloid leukemia. **Cancer Res.**, **49**: 3057, 1989.

Gosh, P.; Komschlies, K. L.; Cippitelli, M.; Longo, D. L.; Subleski, J.; Ye, J.; Sica, A.; Young, H. A.; Wiltout, R. H.; Ochoa, A. C. Loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. **J. Natl. Cancer Inst.**, **87**: 1478, 1995.

Hamilton, J.A. Colony stimulin factors, cytokines and monocyte-macrophages – some controversies. **Immunol. Today**, **14**: 18-24, 1993.

Hardy, C.L., Balducci, L. Review: Hematopoietic alterations in cancer. **Am. J. Med. Sci.** **290**:196-205, 1985.

Hayatsu, H.; Arimoto, S.; Negishi, T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mut. Res.**, **202**: 429-446, 1988.

Hilkens, C.M.U., Vermculen, H., Joost-van-Neerven, R.J., Snijdwint, F.G.M., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L. Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E₂ critically depends on interleukin-2. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 59–63, 1995.

Jayaram, S.; Walwaikar, P. P.; Rajadhyaksha, S. S. Evaluation of the efficacy of a preparation containing combination of Indian medicinal plants in patients of generalized weakness. **Indian Drugs.**, **30(10)**: 498-500, 1993.

Justo, G. Z.; Duran, N.; Queiroz, M. L. S. Myelopoietic response in tumor-bearing mice by na aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **Eur. J. Pharmacol.**, **388**: 219, 2000.

Justo, G.Z.; Silva, M.R.; Queiroz, M.L.S. Effects of a green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacol. Immnotoxicol.**, **23**: 119-123, 2001.

Karnick, C. R. A double blind placebo controlled clinical studies on the effects of *Withania somnifera* and *Panax ginseng* extracts on psychomotor performance in healthy Indian volunteers. **Indian Medicine.**, **3(2,3)**: 1-5, 1981.

Keeb, G., Lala, P.K. Effect of Ehrlich ascites tumour transplantation in mice on the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies in vitro. **Eur. J. Cancer** **14**:331–342, 1978.

- Kobari, L., Weil, D., Lemoine, F.M., Dubois, C., Thian, D., Bailou, C., Guigon, M., Gorin, N.C., Najman, A. Secretion of tumour necrosis factor- α by fresh human acute nonlymphoblastic leukemic cells: role in the disappearance of normal CFU-GM progenitors. **Exp. Hematol.** **18**: 187-192, 1990.
- Koo, A. S.; Armstrong, C.; Bochner, B.; Shimabukuro, T.; Tso, C. L.; De Kernion, J. B.; Belldedrum, A. Interlukin-6 and renal cell cancer: production, regulation and growth effects. **Cancer Immunol. Immunother.**, **35**: 97, 1992.
- Koyama, S.; Fukao, K. Phenotypic analysis of nylon-wool-adherent suppressor cells that inhibit the effector process of tumor cell lysis by lymphokine-activated killer cells in patients with advanced gastric carcinoma. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, **120**: 240, 1994.
- Kumagai, H., Masuda, T., Sakashita, M., Ishizuka, M., Takeuchi, T. Modulation of macrophage activity in tumour-bearing mice by cytogenin. **J. Antibiot.**, **48**: 321-325, 1995.
- Kuppurajan, S. Effect of Ashwagandha (*Withania somnifera*) on the process of aging in human volunteers. **J. Res. Ayurveda and Sidda.** 247-258, 1980.
- Kurup, P. A. Antibiotic principle of the leaves of *W. somnifera*. **Curr. Sci. (India)**, **25**: 57-58, 1956.
- Kuttan, G.; Davis, L. Sppressive effect of cyclophosphamide-induce toxicity by *Withania somnifera* extract in mice. **J. Ethnopharmacol.**, **62**: 209-214, 1998.
- Lala, P. K.; Parhar, R. S.; Singh, P.; Lala, P. K. Cure of murine Ehrlich ascites tumors with chronic oral indomethacin therapy combined with intraperitoneal administration of LAK cells and IL-2. **Cancer Lett.**, **51**: 27, 1990.
- Lala, P.K.; Terrin, M.; Lind, C.; Kaizer, L. Hematopoietic redistribution in tumor-bearing mice. **Exp. Hematol.** **6**:283, 1977.
- Lavie, D.; Kirson, L.; Glotter, E. **Israel J. Chem.** **5(6)**: 671-678, 1968.
- Li, X-F.; Takiuchi, J. P.; Katagiri, T.; Yamamoto, N.; Nagata, T.; Ono, S.; Fujiwara, H.; Hamaoka, T. Transforming growth factor- β (TGF- β)-mediated immunossuppression in the tumor-bearing state: enhanced production of TGF- β and a progressive increase in TGF- β susceptibility of antitumor CD4⁺ T cell activity. **Jpn. J. Cancer Res.**, **84**: 315, 1993.

- Liles, W.C.; Van Voorhis, W.C. Review: Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. **J. Infect. Dis.**, **172**:1061-1075, 1995.
- Liu, Z.; Cheers, C. The cellular source of interleukin-6 during *Listeria* infection. **Infect. Immun.**, **61**: 2626-31, 1993.
- Liu, Z.; Simpson, R. J.; Cheers, C. Interaction of interleukin-6, tumour necrosis factor and interleukin-1 during *Listeria* infection. **Immunology**, **85**: 562-7, 1995.
- Lowes, M.A.; Bishop, G.A.; Grotty, K.; Barnetson, R.S.; Halliday, G.M. T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. **J. Invest. Dermatol.**, **108**:914-919, 1997.
- MacGregor, J. T.; Heddle, J. A.; Hite, M.; Margolin, B. H.; Ramel, C.; Salamone, M. F.; Tia, R. R.; Wild, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mut. Res.**, **189**: 103-112, 1987.
- Majeed, M.; Prakash, L.; Badmaev, V.; Gopinathan, S. Ashwagandha (Indian Ginseng) an adaptogen. **NutriScience Publishers, Inc. 6**: 1-68, 2000.
- Manoharan, K.; Banerjee, M. R. β -Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell. Biol. Int. Rep.**, **9**: 783-789, 1985.
- Mantovani, A.; Botazzi, B.; Colotta, F.; Sozzani, S.; Ruco, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today**, **13**: 239, 1992.
- McIntosh, L. C.; Morrice, L. M.; Udagawa, Y.; Thomson, A. W. Influence of tumor carriage on the production of lymphokines affecting macrophage behaviour. *Immunol.*, **57**: 359, 1986.
- McIntosh, L. C.; Thomson, A. W. Effects of soluble mediators generated during growth of the Landschutz ascites carcinoma on the chemotaxis of normal and *Corynebacterium parvum*-stimulated peritoneal leukocytes. **Br. J. Exp. Pathol.**, **65**: 441, 1984.
- Metcalf, D. Clonal culture of hematopoietic cells. **Elsevier Science Publisher, Amsterdã, Nova York / Oxford**, 1984^a.

Metcalf, D. The hematopoietic colony stimulating factors. **Elsevier Science Publisher, Amsterdã**, 1984^b.

Metcalf, D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors – **Review. Blood.67**: 257-267, 1986.

Moore, S.C., Theus, S.A., Barnett, J.B., Soderberg, L.S. Bone marrow natural suppressor cells inhibit the growth of myeloid progenitor cells and synthesis of colony-stimulating factors. **Exp. Hematol. 20**: 1178-1183, 1992.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.65(1-2)**:55-63, 1983.

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.

Nelson, A. S.; Parhar, R. S.; Scodras, J. M.; Lala, P. K. Characterization of macrophage subsets regulating murine natural killer cell activity. **J. Leukoc. Biol., 48**:382, 1990.

Normann, S.; Besedovsky, H.; Schardt, M.; del Rey, A. On the mechanism of anti-inflammation induced by tumor transplantation, surgery, and irritant rejection. **J. Leukoc. Biol., 49**: 455, 1991.

Oghiso, Y., Yamada, Y., Ando, K., Ishihara, H., Shibata, Y. Differential induction of prostaglandin E₂ -dependent and -independent immune suppressor cells by tumor-derived GM-CSF and M-CSF. **J. Leukocyte Biol. 53**: 86–92, 1993.

Pak, A. S.; Ip, G.; Wright, M. A.; Young, M. R. Treating tumor-bearing mice with low-dose gamma-interferon plus tumor necrosis factor α to diminish immune suppressive granulocyte-macrophage progenitor cells increases responsiveness to interleukin-2 immunotherapy. **Cancer Res., 55**: 885, 1995.

- Parhar, R. S.; Lala, P. K. Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. **Cell. Immunol.**, **93**: 265, 1985.
- Parhar, R.S., Lala, P.K. Prostaglandin E₂ -mediated inactivation of various killer lineage cells by tumour-bearing host macrophages. **J. Leukocyte Biol.** **44**:185–190, 1988.
- Parker, A.N.; Pragnell, I.B. Inhibitors of haemopoiesis and their potential clinical relevance. **Blood Rev.****9**(4):226-233, 1995.
- Pelus, L. M.; Broxmeyer, H. E.; Kurle, J. I.; Moore, M. A. S. Regulation of macrophage and granulocyte proliferation. **J. Exp. Med.**, **150**: 277, 1979.
- Pessina, A., Brambilla, P., Villa, S., Marocchi, A., Mocarelli, P. Factors produced by macrophages and tumour cells: Influence on the granulocytic precursor cells (CFU-C) in normal and tumour bearing mice. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** **102**:235–244, 1982^a.
- Pessina, A., Brambilla, P., Villa, S., Mocarelli, P. CFU-S and CFU-C proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich ascitic fluid. **Oncology** **39**:391–395, 1982^b.
- Power, F. B.; Salway, A. H. The constituents of *Withania somnifera*. **J. Chem. Soc.**, **99**:1490, 1911.
- Queiroz, M L S. Células pluripotenciais hematopoéticas em cultura – revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, **40** (5): 421-426, 1988.
- Queiroz, M. L. S.; Justo, G. Z.; Valadares, M. C.; Pereira-da-Silva, F. R. R.; Muller, A. H. Adjuvant effect of *Pluchea quitoc* extract on the resistance of tumor-bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, **23**: 215, 2001.
- Rahal, D. M.; Reinsh, E.; Osmond, D. G. Changes in the populations of Null, NK1.1⁺, and Thy1¹⁰ lymphocytes in the bone marrow of tumor-bearing mice: Effect of Indomethacin treatment. **Cell. Immunol.**, **139**: 218, 1992.
- Ribeiro, L. R.; Lima, P. L. A.; Delmanto, R. D.; Sugui, M. M.; Eira, ^a F.; Salvadori, D. M. F.; Speit, G. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. **Mut. Res.**, **496**: 23-32, 2001.

Roll, J. T.; Young, K. M.; Kurtz, R. S.; Cuzuprinski, C. J. Human rTNF alpha augments anti-bacterial resistance in mice: potentiation of its effects by recombinant human rIL-1 alpha. **Immunology**, **69**: 316-2, 1990.

Roy, M.R., Guhathakurta, S., Roychowdhury, J. Hematological changes in experimental tumours. **Ind. J. Med. Res.** **74**: 896-903, 1981.

Ruhl, S.; Pluznik, D. H. Dissociation of early and late markers of murine myeloid differentiation by interferon- γ and interleukin-6. **J. Cell. Physiol.**, **155**: 130, 1993.

Ruiz de Morales, J.; Vélez, D.; Subiza, J. L. Ehrlich tumor stimulates extramedular hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Exp. Hematol.**, **27**: 1757, 1999.

Ruszala-Mallon, V.; Silva, J.; Lumanglas, A. L.; Durr, F. E.; Wang, B. S. Depression of cell-mediated immunity in plasmacytoma-bearing mice. **Immunol. Cell. Biol.**, **69**: 11, 1991.

Saarloos, M. N.; Khoo, N. K.; Lala, P. K. Effects of cancer immunotherapy with indomethacin and interleukin-2 on murine hemopoietic stem cells. **Cancer Res.**, **52**: 6452, 1992.

Sachs, L. The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to clinic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**: 4742-4749, 1996.

Sadique, J.; Anabalagan, K. Traditional Medicine-A Biochemical Approach (Ashwagandha and Acute-phase proteins). **Abstracts of the 51st Annual Meeting of Society of Biological Chemists, Chandigarh**, 115, 1982.

Samal, B. B.; Steams, G. W.; Boone, T. C.; Arakawa, T. Comparative analysis of the effects of recombinant cytokines on the growth and differentiation of ML-1, a human myelogenous leukemic cells line. **Leuk. Res.**, **17**: 299, 1993.

Sato, T. Active specific immunotherapy with hapten-modified autologous melanoma cell vaccine. **Cancer Immunol. Immunother.**, **43**: 174-179, 1997.

- Segura, J. A.; Barbero, L. G.; Márques, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunol. Letters**, **74**: 111, 2000.
- Segura, J.A., Barbero, L.G., Marquez, J. Early tumour effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Lett.** **414**: 1–6, 1997.
- Steven, A.; Rosenberg, D.; Longo, L.; Lotze, M.T. Principles and Application of Biologic Therapy. In: Devia, V.T., Jr., Hellmann, S.; Rosenberg, S.A. (Eds). 301-302, 1985.
- Sigiura, K. Tumor transplantation. Em: Methods of animal experimentation, W.I. Gray ed., **Academic Press: New York, N. Y.**, **2**:122-171, 1965.
- Singh, R. H.; Nath, S. K.; Behere, P. B. Depressive illness-a therapeutic evaluation with herbal drugs. **J. R. A. S.** **11**:1-6, 1989.
- Smyth, M. J.; Kelly, J. M.; Baxter, A. G.; Korner, H.; Sedgwick. An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. **J. Exp. Med.**, **188**: 1611, 1998.
- Sokol, R. J.; Hudson, G. Disordered function of mononuclear phagocytes in malignant disease. **J. Clin. Pathol.**, **36**: 316, 1983.
- Souza Brito, A. R. M.; Souza Brito, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **J. Ethnopharmacol.**, **714**: 136-142, 1993.
- Sporn, M. B. Chemoprevention of cancer. **Lancet.**, **342**: 1211-1213, 1993.
- Stites, D.P.; Terr, A.I.; Parlsow, T.G. *Imunologia Médica*. **9nd ed. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro**, 2000.
- Subiza, J.L., Vinuela, J.E., Rodriguez, R., Gil, J., Figueredo, M.A., De la Concha, E.G. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumour-bearing mice. **Int. J. Cancer** **44**: 307–314, 1989.
- Sudhir, S.; Budhiraja, R. D.; Miglani, G. P.; Arora, B.; Grupta, L. C.; Garg, K. N. Pharmacological studies on the leaves of *Withania somnifera*. **Planta Medica.**, 61-63, 1986.

- Tada, T.; Ohzeki, S.; Utsumi, K.; Takiuchi, H.; Muramatsu, M.; Li, X-F.; Shimizu, J.; Fujiwara, H.; Hamaoka, T. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. **J. Immunol.**, **146**: 1077, 1991.
- Takahashi, M.; Fujimoto, S.; Takai, M.; Ohno, K.; Endoh, F.; Masuda, Y.; Obata, G. 2-Color flow cytometric analysis of splenic lymphocyte subpopulations in patients with gastric-cancer. **Surg. Today**, **22**: 35, 1992.
- Talmadge, J. E.; Key, M.; Fidler, I. J. Macrophage content of metastatic and non-metastatic rodent neoplasms. **J. Immunol.**, **126**: 2245, 1981.
- Tanosaki R., Okamoto S., Akatsuka N., Ishida A., Michikawa N., Masuda Y., Uchida H., Murata M., Kizaki M., Ikeda Y. Dose escalation of biweekly cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone using recombinant human granulocyte colony stimulating factor in non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer**.**74(7)**:1939-1944, 1994.
- Tetsuhiro, T.; Atsuhito, Y.; Koichi, H.; Torigoe, T.; Araya, J.; Watanabe, N. *et al.* Interleukin-10 natural killer (NK) sensitivity of tumor cells by downregulating NK target structure expression. **Cellular Immunol.**, **198**:103-110, 1999.
- 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 Dicyclopentadienildichlorotitanium (IV). **Int. J. Immunopharmacol.** **20**:573-581, 1998.
- Valadares, M.C.; Queiroz, M.L.S. The effects of a Titanocene Dichloride derivative TiIV (C₅H₅)₂NCS₂, on the hematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **439**: 35-42, 2002.
- Vodovotz, Y.; Bogdan, C.; Paik, J.; Xie, Q. W.; Nathan, C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor-beta. **J. Exp. Med.**, **188**: 1651, 1993.
- Walker, T. M.; Burger, C. J.; Elgert, K. D. Tumor growth alters T cell and macrophage production of and responsiveness to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: partial dysregulation through interleukin-10. **Cell. Immunol.**, **154**: 342, 1994.

- Waters, M. D.; Brady, A. L.; Stack, H. F.; Brockman, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mut. Res.**, **238**: 57-85, 1990.
- Watson, G. A.; Lopez, D. M. Aberrant antigen presentation by macrophages from tumor-bearing mice is involved in the down-regulation of their T-cell responses. **J. Immunol.**, **155**: 3124, 1995.
- Watson, G.A., Fu, Y.X., Lopez, D.M. Splenic macrophages from tumour-bearing mice co-expressing MAC-1 and MAC-2 antigens exert immunoregulatory functions via 2 distinct mechanisms. **J. Leukocyte Biol.** **49**: 126–138, 1991.
- Wattenberg, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res.**, **45**: 1-8, 1985.
- Whintrout, R.H.; Varesio, L. Activation of macrophages for cytotoxic and suppressor-effector functions. In: Oppenheim J. J. Immunophysiol.: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation. **Oxford University Press**. 365-385, 1991.
- Who. Regional Office of Western Pacific. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. **Manila: Who**, 1993.
- Wong, D.A.; Bishop, G.A.; Lowes, M.A.; Cooke, B.; Barnetson, R.S.; Halliday, G.M. Cytokine profiles in spontaneously regressing basal cell carcinomas. **Br. J. Dermatol.**, **143**: 91-98, 1997.
- Yamamoto, N., Zou, J.P., Li, X.F., Takenaka, H., Noda, S., Fujii, T., Ono, S., Kobayashi, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Fujiwara, H., Hamaoka, T. Regulatory mechanisms for production of IFN- γ and TNF- α by antitumour T-cells or macrophages in the tumour-bearing state. **J. Immunol.**, **154**: 2281–2290, 1995.
- Ye, Q. W.; Moky, M. B.; Pyle, J. M.; Dray, S. Suppression of antitumor immunity by macrophages in spleens of mice bearing a large MOPC-315 tumor. **Cancer Immunol. Immunother.**; **16**: 162, 1984.
- Young, M. R.; Wright, M. A. Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors: interferon- γ plus tumor necrosis factor- α synergistically reduce immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells, and diminish tumor recurrence and metastasis. **Cancer Res.**, **52**:6335, 1992.

Young, M. R.; Aquino, S.; Young, M. E. Differential induction of hematopoiesis and immune suppressor cells in the bone marrow versus in the spleen by Lewis lung carcinoma variants. **J. Leukoc. Biol.**, **45**:262, 1989.

Young, M. R.; Wright, M. A.; Matthews, J. P.; Malik, I.; Prechel, M. Sppression on T-cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor- β and nitric oxide. **J. Immunol.**, **156**: 1916, 1996.

Young, M.R., Wright, M.A., Pandit, R. Myeloid differentiation treatment to diminish the presence of immune-suppressive CD34q cells within human head and neck squamous cell carcinomas. **J. Immunol.**, **159**: 990–996, 1997.

Yue, F.Y.; Dummer, R.; Geertsen, R.; Hofbauer, G.; Laine, E.; Manolio, S. *et al.* Interleukin 10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. **Int. J. Cancer**, **71**:630-637, 1997.

Zicari, A.; Lipari, M.; Di Renzo, L.; Longo, A.; Antonelli, G.; Pontieri, G. M. In vivo and in vitro macrophage activation induced by IFN gamma spontaneously released by spleen cells from tumor-bearing mice. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents.**, **6**: 65, 1992.

8- APÊNDICE

Tabela 4-Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,05$ comparado ao controle; ^c $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE; ^d $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

Número de CFU-GM/Fêmur ($\times 10^3$)								
	CTRL	TAE ^a	20 ^d mg/Kg	50 ^{bc} mg/Kg	100 ^{ac} mg/Kg	TAE+20 ^c mg/Kg	TAE+50 ^c mg/Kg	TAE+100 ^{ac} mg/Kg
1	16,17	5,40	12,60	12,70	20,90	12,16	19,62	22,75
2	11,31	5,30	10,38	13,20	20,12	17,19	20,25	24,94
3	14,93	6,30	13,00	12,90	19,48	14,55	18,90	19,72
4	10,34	7,95	12,80	13,70	24,75	11,17	18,90	17,95
5	11,15	6,82	11,56	15,20	25,08	16,00	15,15	16,90
6	14,57	8,12	10,50	12,80	18,93	16,40	12,74	22,62
M	13,07	6,64	11,80	13,41	21,54	14,57	17,59	20,81
DP	2,43	1,21	1,17	0,94	2,69	2,43	2,97	3,12

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 5-Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,05$ comparado ao controle; ^c $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

Número de CFU-GM/Baço ($\times 10^2$)								
	CTRL	TAE ^a	20 ^c mg/Kg	50 ^c mg/Kg	100 ^c mg/Kg	TAE+20 ^{bc} mg/Kg	TAE+50 ^c mg/Kg	TAE+100 ^c mg/Kg
1	16,92	550,8	15,12	15,12	18,72	93,76	20,88	13,68
2	10,08	254,8	18,72	19,52	19,00	91,80	23,08	15,84
3	12,60	225,0	15,50	14,40	19,16	80,32	31,52	17,00
4	10,44	352,8	18,64	19,64	16,48	90,40	30,64	15,92
5	10,28	372,8	17,56	18,90	19,60	88,20	34,56	12,96
6	11,92	330,4	15,64	17,88	18,80	85,52	30,24	15,64
M	12,04	347,7	16,86	17,57	18,62	88,33	28,48	15,17
DP	2,59	114,8	1,64	2,28	1,09	4,85	5,30	1,52

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 6-Efeito do soro de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos, diretamente sobre a cultura de células progenitoras da medula óssea de animais normais. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

Fatores estimuladores de colônias (Unidades de CSF/mL)								
	CTRL	TAE ^a	20 ^{a b} mg/Kg	50 ^{ab} mg/Kg	100 ^{ab} mg/Kg	TAE+20 ^{ab} mg/Kg	TAE+50 ^{ab} mg/Kg	TAE+100 ^{ab} mg/Kg
1	0,9	13,5	4,5	3,8	4,9	11,3	12,0	10,8
2	1,5	16,5	3,3	3,3	5,2	13,5	9,8	12,8
3	1,2	12,8	4,0	4,5	4,7	14,3	10,3	9,9
4	0,7	14,0	3,0	4,2	4,8	11,8	11,7	10,5
5	0,8	13,7	3,8	3,8	4,8	12,7	11,3	11,0
6	1,3	14,8	4,8	4,7	3,7	12,3	12,7	11,5
M	1,06	14,21	3,9	4,0	4,6	12,65	11,30	11,08
DP	0,30	1,29	0,68	0,51	0,51	1,10	1,08	0,99

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 7-Peso do baço de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

Peso do Baço (em mg)								
	CTRL	TAE ^a	20 ^b mg/Kg	50 ^b mg/Kg	100 ^{a,b} mg/Kg	TAE+20 ^b mg/Kg	TAE+50 ^b mg/Kg	TAE+100 ^b mg/Kg
1	170	350	190	120	90	240	160	150
2	180	400	150	120	110	190	190	160
3	150	390	160	190	110	200	150	170
4	170	410	120	100	90	170	160	100
5	150	390	110	160	90	170	160	150
6	150	400	110	120	100	200	150	180
M	161,6	390	140	138,3	98,3	195	161,6	155
DP	13,29	20,97	32,24	29,94	9,83	25,88	14,72	20,73

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 8-Resposta proliferativa das células esplênicas de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,01$ comparado ao controle; ^c $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

Resposta proliferativa das células esplênicas (%)								
	CTRL	TAE ^a	20 ^c mg/Kg	50 ^c mg/Kg	100 ^c mg/Kg	TAE+20 ^c mg/Kg	TAE+50 ^c mg/Kg	TAE+100 ^{bc} mg/Kg
1	128	33,5	79	105	116	107	114	150
2	109	42,5	87	108	129	101	107	114
3	102	41,5	81	102	103	105	125	128
4	108	45,9	97	133	155	109	97	158
5	106	43,0	91	102	126	108	102	193
M	110,6	41,2	87	110	125,8	106	109	148,6
DP	10,09	4,64	7,34	13,09	19,22	3,16	10,93	30,34

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 9-Concentração de IL-1 de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao TAE; ^c $P < 0,01$ comparado ao TAE.

Concentração de IL-1 (Pg/mL) 24 horas								
	CTRL	TAE	20 ^{ab} mg/Kg	50 ^{ab} mg/Kg	100 ^{ab} mg/Kg	TAE+20mg/Kg	TAE+50 ^c mg/Kg	TAE+100 ^b mg/Kg
1	173,0	137,8	280,4	303,5	319,5	159,3	192,5	198,3
2	169,6	128,1	278,5	284,3	228,9	156,4	186,7	194,9
3	161,3	132,0	278,5	342,9	288,2	147,8	182,8	196,6
4	163,2	159,3	310,9	285,5	291,7	138,1	196,4	198,8
5	162,1	135,9	255,4	295,3	322,0	145,7	175,0	204,4
6	170,9	147,6	268,3	309,4	335,9	135,9	184,7	206,6
M	166,6	140,1	277,8	303,4	314,3	147,2	186,3	199,9
DP	5,03	11,46	19,72	21,66	19,78	9,42	7,52	4,57

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 10-Concentração de IL-1 animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,05$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao TAE.

Concentração de IL-1 (Pg/mL) 48 horas								
	CTRL	TAE	20 ^{ab} mg/Kg	50 ^{ab} mg/Kg	100 ^{ab} mg/Kg	TAE+20mg/Kg	TAE+50 ^{ab} mg/Kg	TAE+100 ^{ab} mg/Kg
1	182,8	165,2	198,1	253,1	272,6	158,9	217,9	262,3
2	186,7	128,1	235,7	235,5	223,8	173,0	253,1	272,0
3	184,7	145,7	268,9	243,3	247,2	116,0	235,5	286,7
4	163,2	133,9	270,7	233,5	227,7	137,8	233,5	253,5
5	151,5	137,8	249,2	234,5	241,4	137,8	231,6	267,1
6	157,4	135,9	258,9	214,0	233,5	137,8	231,5	259,3
M	171,0	141,1	246,9	235,6	241,0	143,5	233,87	266,82
DP	15,48	13,12	27,21	12,94	17,69	19,80	11,29	11,63

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 11-Concentração de IL-6 de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,01$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao controle; ^c $P < 0,001$ comparado ao TAE.

Concentração de IL-6 (Pg/mL) 24 horas								
	CTRL	TAE ^a	20 ^{ac} mg/Kg	50 ^{bc} mg/Kg	100 ^{bc} mg/Kg	TAE+20 ^{ac} mg/Kg	TAE+50 ^c mg/Kg	TAE+100 ^c mg/Kg
1	572,8	380,0	631,6	822,5	833,6	632,3	543,4	641,5
2	585,9	288,5	556,5	881,3	899,6	736,2	556,5	605,5
3	599,0	334,3	847,3	847,3	951,3	844,1	569,6	621,8
4	481,3	394,4	965,0	850,6	870,2	641,5	559,8	631,6
5	500,9	365,0	559,8	837,5	851,3	742,8	729,7	791,8
6	523,8	327,1	817,9	899,6	902,4	827,7	644,7	710,1
M	543,9	348,2	729,6	856,4	884,7	737,4	600,6	667,0
DP	48,61	30,06	170,57	28,66	42,20	89,23	72,73	70,93

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 12-Concentração de IL-6 de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,01$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao controle; ^c $P < 0,001$ comparado ao TAE; ^d $P < 0,01$ comparado ao TAE.

Concentração de IL-6 (Pg/mL) 48 horas								
	CTRL	TAE	20 mg/Kg	50 ^a mg/Kg	100 ^{ac} mg/Kg	TAE+20 ^{bd} mg/Kg	TAE+50 ^{bc} mg/Kg	TAE+100 ^{bc} mg/Kg
1	599,0	608,8	572,8	752,6	984,6	723,2	1069,6	896,4
2	536,9	553,2	631,6	723,2	863,7	683,9	965,0	968,3
3	566,3	579,4	602,2	736,2	922,5	804,9	1017,3	952,3
4	523,8	612,0	602,2	710,1	899,6	847,3	1046,7	866,9
5	631,6	703,5	739,5	755,8	1095,7	873,5	1301,6	1069,6
6	576,1	657,8	670,9	733,0	997,7	860,4	1174,1	968,3
M	572,2	619,1	636,5	735,1	960,6	798,8	1095,7	953,6
DP	39,71	54,21	60,37	17,36	83,38	78,33	122,35	70,25

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 13-Concentração de IL-10 de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao TAE.

Concentração de IL-10 (Pg/mL) 24 horas								
	CTRL	TAE ^a	20 ^b mg/Kg	50 ^b mg/Kg	100 ^b mg/Kg	TAE+20 ^b mg/Kg	TAE+50 ^b mg/Kg	TAE+100 ^b mg/Kg
1	284,0	417,0	251,8	239,6	324,6	296,2	235,7	269,0
2	294,0	554,0	201,8	231,2	242,3	254,0	220,7	268,5
3	223,0	463,0	269,6	223,5	330,1	209,6	221,2	220,1
4	273,0	459,0	316,8	239,0	301,8	283,5	221,8	271,8
5	291,0	427,0	292,9	244,6	229,0	287,9	242,3	287,9
6	276,0	449,0	236,8	235,1	275,1	299,0	234,0	283,5
M	273,5	461,5	261,6	235,5	283,8	271,7	229,2	266,8
DP	26,05	48,76	40,93	7,41	42,26	34,40	9,25	24,21

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 14-Concentração de IL-10 de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao TAE; ^c $P < 0,05$ comparado TAE.

Concentração de IL-10 (Pg/mL) 48 horas								
	CTRL	TAE ^a	20 ^b mg/Kg	50 ^b mg/Kg	100 ^b mg/Kg	TAE+20 ^b mg/Kg	TAE+50 ^{ac} mg/Kg	TAE+100 ^b mg/Kg
1	284,6	476,0	234,6	269,6	247,0	396,0	405,0	369,5
2	289,6	484,0	289,5	239,7	231,8	376,0	399,0	279,5
3	311,2	496,0	239,7	244,6	275,1	377,0	437,0	281,3
4	281,8	479,0	246,8	235,1	309,0	342,0	435,0	235,7
5	272,9	402,0	252,9	275,0	283,8	349,0	402,0	269,7
6	257,3	454,0	267,3	267,5	249,9	398,0	409,0	307,8
M	282,9	465,1	255,1	255,2	266,1	373,0	414,5	290,5
DP	17,91	33,84	20,31	17,36	28,42	23,30	16,99	45,12

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 15-Concentração de IFN- γ de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. . Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,05$ comparado ao controle; ^c $P < 0,01$ comparado ao controle; ^d $P < 0,001$ comparado ao TAE.

Concentração de IFN- γ (Pg/mL) 24 horas								
	CTRL	TAE ^a	20 ^a mg/Kg	50 ^{ad} mg/Kg	100 ^{ad} mg/Kg	TAE+20 ^{bd} mg/Kg	TAE+50 ^{cd} mg/Kg	TAE+100 ^{ad} mg/Kg
1	525,4	352,8	350,8	427,6	573,1	531,2	583,5	620,1
2	488,1	416,2	369,5	454,1	575,8	547,6	588,8	610,3
3	543,7	334,5	383,5	450,8	589,4	537,8	534,5	613,6
4	514,2	352,8	384,8	422,7	571,4	570,5	514,9	629,9
5	517,5	334,5	375,0	458,7	565,4	590,1	601,8	595,7
6	501,2	383,5	378,3	429,3	571,8	580,3	568,4	592,8
M	515,0	362,4	373,7	440,5	574,5	559,7	565,3	610,4
DP	19,24	31,87	12,51	15,69	8,07	24,16	33,80	14,23

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 16-Concentração de IFN- γ de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao TAE.

Concentração de IFN- γ (Pg/mL) 48 horas								
	CTRL	TAE ^a	20 ^b mg/Kg	50 ^c mg/Kg	100 ^c mg/Kg	TAE+20 ^c mg/Kg	TAE+50 ^{a,c} mg/Kg	TAE+100 ^{a,c} mg/Kg
1	669,1	233,2	563,3	624,7	660,7	695,3	1546,9	2203,8
2	665,9	269,1	526,0	660,7	690,1	692,0	1658,0	2239,7
3	665,9	249,5	594,6	641,0	673,7	692,0	1602,5	2220,1
4	603,1	261,6	586,1	648,9	642,4	690,1	1654,8	2203,8
5	622,7	295,3	569,8	622,7	631,1	618,2	1545,6	2131,9
6	612,9	301,8	576,3	635,8	622,7	654,1	1783,5	2667,8
M	640,0	268,4	569,4	639,0	653,4	673,6	1631,9	2277,9
DP	30,26	26,38	24,02	14,48	25,95	31,22	89,14	194,50

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 17-Concentração de TNF- α de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 24 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,001$ comparado ao TAE.

Concentração de TNF- α (Pg/mL) 24 horas								
	CTRL	TAE ^a	20 ^b mg/Kg	50 ^b mg/Kg	100 ^b mg/Kg	TAE+20 ^b mg/Kg	TAE+50 ^{ab} mg/Kg	TAE+100 ^{ab} mg/Kg
1	111,0	119,0	146,4	152,9	171,1	122,9	124,2	247,7
2	101,9	115,0	141,2	138,6	169,7	122,9	125,5	356,2
3	107,1	116,3	143,8	145,1	173,9	122,9	124,2	201,9
4	100,5	133,3	141,9	137,3	168,6	121,6	112,5	263,4
5	100,7	137,3	140,8	158,2	156,0	175,2	180,4	340,5
6	100,5	120,3	143,7	147,7	165,8	117,7	160,8	270,6
M	103,6	123,5	142,9	146,6	167,5	135,5	137,9	280,1
DP	4,41	9,36	2,11	8,11	6,22	21,88	26,47	58,24

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 18-Concentração de TNF- α de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. Os sobrenadantes da cultura foram coletados 48 horas após incubação. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,01$ comparado ao controle; ^c $P < 0,001$ comparado ao TAE.

Concentração de TNF- α (Pg/mL) 48 horas								
	CTRL	TAE ^a	20 ^c mg/Kg	50 ^{bc} mg/Kg	100 ^{ac} mg/Kg	TAE+20 ^{ac} mg/Kg	TAE+50 ^c mg/Kg	TAE+100 ^{ac} mg/Kg
1	140,7	68,6	148,4	168,1	197,9	172,2	163,4	281,7
2	149,0	61,9	113,1	198,7	197,4	190,8	172,5	288,9
3	124,2	63,3	130,1	162,7	177,0	185,9	167,3	285,3
4	142,5	51,6	133,9	160,1	173,5	179,6	153,5	285,6
5	147,2	59,5	132,7	143,8	169,2	169,3	158,8	290,2
6	124,2	61,6	103,3	191,3	181,4	143,8	150,5	295,4
M	138,0	61,14	126,9	170,8	182,7	173,6	161,0	287,8
DP	11,09	5,55	16,13	20,56	12,22	16,69	8,37	4,76

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.

Tabela 19-Especificidade de lise de células NK de animais inoculados com TAE (6×10^6 cél/mL) e tratados com diferentes doses do extrato de *Withania somnifera* (20, 50 e 100 mg/Kg) por 10 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24 h após o término do tratamento. Os grupos controles receberam somente diluente da droga. ANOVA, Teste Tukey. ^a $P < 0,001$ comparado ao controle; ^b $P < 0,01$ comparado ao controle; ^c $P < 0,001$ comparado ao grupo inoculado com TAE.

Especificidade de Lise de células NK (%)								
Parâmetro 50:1								
	CTRL	TAE ^a	20 ^{b c} mg/Kg	50 ^{a c} mg/Kg	100 ^{a c} mg/Kg	TAE+20 ^{a c} mg/Kg	TAE+50 ^{a c} mg/Kg	TAE+100 ^{a c} mg/Kg
1	25,62	2,61	22,18	40,65	46,37	13,05	38,95	45,59
2	28,50	2,35	30,68	37,66	49,16	13,56	36,51	49,94
3	23,73	2,18	26,78	34,53	50,30	18,10	31,94	40,34
4	19,57	3,37	27,64	36,09	53,82	12,84	41,81	47,46
5	21,46	2,58	28,82	37,44	52,96	14,64	49,81	41,70
6	22,14	3,19	22,59	36,14	53,09	13,25	50,66	45,43
M	23,50	2,71	26,44	37,13	50,95	14,24	41,61	45,07
DP	3,19	0,46	3,41	2,05	2,88	1,99	7,42	3,56

CTRL = Controle;

M = Média;

DP = Desvio Padrão.