Estudo da Resposta Imunológica induzida por *Arnica montana* L.

Márcia Faria Marques

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Câmpus de Araraquara

Estudo da Resposta Imunológica induzida por *Arnica montana* L.

Márcia Faria Marques

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista-UNESP
para a obtenção do título de Doutor
em Análises Clínicas.

Araraquara/2006

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS
LISTA DE FIGURAS E TABELAS
RESUMO
ABSTRACT
I- INTRODUÇÃO----------11
1.1- Fitoterapia ----------12
1.2-Homeopatia----------13
1.3- *Arnica montana* Linné----------16
1.4- Resposta Imunológica----------19
II- OBJETIVOS----------28
III- MATERIAIS E MÉTODOS----------30
3.1- *Arnica montana*----------31
3.2 -Animais ----------31
3.3 –Obtenção do exsudato peritoneal----------32
3.4- Obtenção de células esplênicas ----------32
3.5 – Determinação da viabilidade celular ----------33
3.6 - Determinação de H_2O_2 ----------34
3.7 - Determinação de NO ----------35
3.8 - Determinação de citocinas----------37
3.9 - Análise estatística----------39
IV- RESULTADOS----------40
V- DISCUSSÃO----------56
VI- CONCLUSÕES ----------76
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS----------78
VIII- ANEXOS ----------106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM	-	*Arnica montana* L.
AM1	-	Tintura-mãe de arnica
BH_4	-	Tetrahidrobiopterina
CH	-	Centesimal Hahnemaniana
Con-A	-	Concanavalina A
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFNγ	-	Interferon-γ
iNOS	-	Óxido Nítrico Sintase
LPS	-	Lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo 0111:B4
MLC	-	Meio Livre de Células
MTT	-	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NF- κβ	-	Fator Nuclear-κβ
NO	-	Óxido Nítrico
PBS	-	Phosphate Buffered Saline
PEC	-	Células do Exsudato Peritoneal
PMA	-	Phorbol Myristate Acetate
RNI	-	Reativo Intermediário do Nitrogênio
ROI	-	Reativo Intermediário do Oxigênio
RPMI-1640	-	Roswell Park Memorial Institute - série 1640
TNF-α	-	Fator de Necrose Tumoral-α

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1-Christian Friedrich Samuel Hahnemann

Figura 2- Exemplos de plantas conhecidas popularmente como Arnica. A) *Arnica montana* Linné; B) *Lychnophora ericoides* Less; C) *Heterotbeca inuloides* Cass.

Figura 3 –Estrutura química do ácido cafeico. R_3=OH

Figura 4 e 5 – Estrutura química da quercetina. R=OH e R' =H

Figura 6 – Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de camundongos Swiss frente às preparações fitoterápicas de *Arnica montana.*

Figura 7 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de camundongos Swiss frente às preparações homeopáticas de *Arnica montana.*

Figura 8- Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana*.

Figura 9- Inibição da produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana*.

Figura 10- Produção de óxido nítrico (NO) por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas de *Arnica montana*.

Figura 11- Produção e inibição de óxido nítrico (NO) por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações homeopáticas de *Arnica montana*.

Figura 12- Produção de TNF-α por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas de *Arnica montana* L.

Figura 13- Produção de TNF-α por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações homeopáticas de *Arnica montana* L.

Figura 14- Produção de interferon gama (IFN-γ) por células esplênicas cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana* L.

Figura 15- Produção de interleucina 4 (IL-4) por células esplênicas cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana* L.

Figura 16- Produção de IL-6 por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana* L.

Figura 17- Produção de IL-1 por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana* L.

Figura 18- Produção de IL-12 por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana*.

Tabela 1. Efeito inibitório das preparações homeopáticas de *Arnica montana* na produção de NO em cultura de macrófagos estimulados por LPS.

Tabela 2. Efeito inibitório das preparações homeopáticas de *Arnica montana* na produção de TNF-α em cultura de macrófagos estimulados por LPS.

RESUMO

A resposta imunológica engloba amplo contexto envolvendo várias células, sendo o macrófago uma das mais importantes na resposta imune-celular. Os macrófagos peritoneais quando ativados liberam mais de cem compostos ao meio extracelular, entre eles os compostos reativos de oxigênio e de nitrogênio, além das citocinas: fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ) e interleucinas (IL-1, 4, 6 e 12). Existem vários estímulos à membrana macrofágica que podem desencadear a liberação de NO, contribuindo para uma ação antimicrobiana, inflamatória, vasodilatadora, neurotransmissora, ou até mesmo de citotoxicidade ou inibição/ativação linfocitária e da agregação de plaquetas. Atualmente há uma forte tendência em se estudar produtos naturais quanto à capacidade de atuação no sistema imunológico. Os medicamentos homeopáticos, conhecidos há mais de 210 anos, visam à ativação das próprias defesas do organismo para eliminar a doença. Estudos baseados em cultivos obtidos de macrófagos podem ser úteis para um melhor entendimento da resposta imunológica. Considerando a importância farmacológica de *Arnica montana* L. (Asteraceae), planta originária das regiões montanhosas do norte da Europa, este estudo avaliou a liberação de H_2O_2, NO, TNF-α, IFN-γ e IL-1, 4, 6 e 12 no sistema imunológico através de macrófagos peritoneais expostos a preparações fitoterápicas e homeopáticas desta planta. Os resultados mostraram que a *Arnica montana* L. foi capaz de promover a liberação de NO, TNF-α, IFN-γ e IL-6. As preparações homeopáticas também apresentaram um efeito inibitório na produção de NO e TNF-α induzida pelo LPS. A análise dos resultados deste trabalho sugere que a *Arnica montana* L. pode modular a ativação dos macrófagos.

ABSTRACT

The immunological response includes wide context involving several cells, being the macrophage one of the most important in the cellular immune response. The peritoneal macrophages when activated they liberate more than a hundred compound to the environment extracellular, among them compound reactive of the oxygen and nitrogen and the tumoral necrosis factor -α (TNF-α), gamma-interferon and interleukynes. The nitric oxide (NO) it is synthesized by several cellular types through isoforms of the enzyme nitric oxide synthase (NOS). The enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) it produces NO starting from activators mechanisms macrophages. Several incentives to the membrane macrophagical that can unchain the liberation of NO, contributing to actions antibacterial, inflammatory, vasodilatation, neurotransmission, or even of citotoxicity or inhibition/activation of lymphocytes. Now there is a strong tendency in studying natural products with relationship to the capacity of performance in the immune system. Macrophages are involved in many different processes but their main function is to provide a defense line against microbial invasion and tumor cells. Once homeopathic medications are aimed at activation of the body's own defense mechanisms to fight an existing disease, assays based in macrophages culture may be useful to enlighten some questions. Considering the pharmacological importance of *Arnica montana* L. this study evaluated the action of NO in the immune system through peritoneal macrophages exposed to the preparations of this plant. The results showed that some of the tested preparations were capable to promote the liberation of NO, TNF-α, INF-γ e IL-6 in cultures of peritoneal macrophages murine. A relationship among the synthesis of NO and TNF-α was observed. Analyzing the results, it is suggested that preparations of *Arnica montana* L. can modulate macrophage activation.

I - INTRODUÇÃO

1.1 FITOTERAPIA

A palavra fitoterapia é derivada do grego, onde *phytos* significa planta. Esse termo foi introduzido mundialmente, pelo médico francês Henry Leclerc. O uso das plantas para tratar diversos transtornos da saúde é uma das formas terapêuticas mais antigas e de maior tradição. Os fitoterápicos têm sido, no caso do Brasil e de muitos países, o suporte da indústria farmacêutica genuinamente nacional de pequeno e médio porte (DI STASI, 1996).

Multiplicam-se a cada dia o interesse e o consumo de medicamentos naturais, sobretudo os de origem vegetal. Esta crescente utilização das plantas medicinais, por vezes de forma indiscriminada e até mesmo abusiva, exige estudos farmacológicos e toxicológicos para melhorar a forma de utilização dos medicamentos fitoterápicos a serem empregados no tratamento de inúmeras patologias (PANIZZA, 1997). O interesse em relação às plantas medicinais favorece a valorização dessa forma de terapêutica popular que serve de modelo para muitos fármacos sintetizados (PRANDO & COLATRELLA, 1984).

O uso de produtos naturais como matéria prima para a síntese de fármacos tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. A etnofarmacologia está inserida no contexto da etnobiologia, estudando o complexo conjunto de relações das plantas e animais com a sociedade humana, do presente e do passado. A abordagem etnofarmacológica oferece a oportunidade de descobrir protótipos, ou seja, novas estruturas com novas atividades (MALONE, 1983).

1.2 HOMEOPATIA

A busca por analgésicos e antinflamatórios mais eficazes e menos tóxicos tem sido uma constante no meio científico. Várias terapias têm sido avaliadas com diferentes resultados. Entre estas terapias encontra-se a Homeopatia, descrita primeiramente pelo filósofo Hipócrates na antiga Grécia, que em 450 a.C. acreditava no princípio da similitude, no qual semelhante pode curar semelhante. Mas foi em 1796 que Christian Friedrich Samuel Hahnemann (Figura 1), um médico alemão decepcionado com a medicina da época, criou os princípios de um novo tipo de medicamento, publicando a obra "Ensaios sobre um novo princípio para descobrir as virtudes curativas das substâncias medicamentosas", onde descreveu os fundamentos desta especialidade da Medicina. Sendo esta obra o marco de fundação da Homeopatia (REBOLLO, 1994).

Figura 1-Christian Friedrich Samuel Hahnemann

A palavra homeopatia também deriva do grego, língua em que "homoios" quer dizer "igual" e "pathos" significa doença. A homeopatia foi introduzida no Brasil por um discípulo francês de Hahnemann, Benoit-Jules Mure, que aqui chegou em 1840.

A homeopatia é a arte de curar doentes por meio de medicamentos que, dados ao homem são, em doses ponderáveis, provocam sintomas semelhantes aos que se

propõe a curar no doente. Esta terapêutica baseia-se em três princípios: a lei dos semelhantes, a experimentação no homem são e o emprego das pequenas doses.

A Lei dos Semelhantes ou "*Similia similibius curantur ou curentur*", ou seja, o semelhante tratado pelo semelhante. Assim, um determinado medicamento dado a indivíduos aparentemente sadios, produz um conjunto de sinais e sintomas. Este mesmo medicamento, em pequenas doses, produzirá a cura em doentes que tenham os sinais e sintomas semelhantes àqueles apresentados anteriormente (BERNSTEIN, 1998).

O segundo princípio baseia-se na Experimentação no Homem Sadio ou "*Experientia in homine sano",* que corresponde à experimentação no homem são, utilizado por Hahnemann. Ela é a base para se escolher um medicamento, possibilitando dessa forma que as manifestações sintomáticas do doente e da droga se combinem fortalecendo e excitando os mecanismos de defesa do organismo em direção ao restabelecimento da saúde. O outro princípio está na desconcentração da matéria-prima de origem do medicamento homeopático (Doses Mínimas ou "*Doses minimae*"). As doses mínimas atuam suavemente, sem agredir, estimulando os mecanismos naturais de defesa (BERNSTEIN, 1998).

A idéia das dinamizações e diluições altas se tornaria um dos principais alvos de estudo no sistema homeopático. Hahnemann e outros cientistas precursores entendiam que deveria haver um limite físico para a diluição de uma substância original, a partir do qual não haveria mais qualquer resíduo da substância original. Contudo, diluições altíssimas, foram usadas na medicina homeopática com sucesso. A questão acerca da diluição e da dinamização não só se tornaria um dos principais pontos de controvérsia entre a homeopatia e a medicina convencional moderna, como ainda é uma das principais áreas de conflito dentro da comunidade homeopática propriamente dita (JONHNNAS, 1996).

Assim, Hahnemann passou a pesquisar substâncias que provocassem os mesmos sintomas da doença que se pretendia curar, administrando-as em seus pacientes e com o intuito de evitar os efeitos da agravação medicamentosa ao diminuir a toxicidade das drogas através da diluição das mesmas, Hahnemann passou a notar que, após agitações vigorosas e ritmadas, os medicamentos passavam a ter seus efeitos potencializados, surgindo assim o princípio da dinamização homeopática.

Reconhecida como especialidade médica há 25 anos, há 13 pela área farmacêutica e há cinco anos pela medicina veterinária e odontologia, a homeopatia enfrenta nos dias de hoje o desafio de provar em bases científicas o seu funcionamento, apesar de não haverem dúvidas a respeito de sua efetividade clínica por parte dos pacientes e médicos.

Isso se justifica pelo fato de seus princípios de diagnóstico e tratamento diferirem do modelo químico-farmacológico convencional. A pesquisa clínica usual para avaliação dos efeitos medicamentosos não funciona para medicamentos homeopáticos, uma vez que burla um princípio homeopático que é tratar o indivíduo em vez da doença.

Desde a sua criação, o tratamento homeopático procura tratar a pessoa como um todo, buscando um conjunto de sintomas existentes no paciente, procurando promover o auto-equilíbrio, ou seja, a equalização da homeostasia.

Através da física quântica é possível comprovar que a conformação das moléculas de solvente é alterada quando uma insignificante porção de soluto é adicionada a uma solução que é dinamizada. Com a dinamização algum tipo de informação existente na substância ativa diluída é transferida para o solvente usado no preparo do remédio, o que atribui a este solvente característica do soluto, justificando o efeito de um remédio tão

pouco concentrado. Assim, a dinamização pode alterar pontes de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo além de forças intermoleculares mais fracas, podendo formar grupos de moléculas de solvente denominadas “clusters”, o que pode confirmar a teoria Hahnemaniana de que informações do soluto podem ser repassadas para o solvente na dinamização do medicamento.

As indicações do medicamento homeopático *Arnica montana* estão bem estabelecidas nas Matérias Médicas Homeopáticas, por ser um dos mais conhecidos remédios homeopáticos. KINOUCHI (1986) como exemplo, a emprega externamente na forma de tintura-mãe e, internamente em várias dinamizações.

1.3 ARNICA

Planta originária das regiões montanhosas do norte da Europa, de terras silicosas, o cultivo da *Arnica montana* L. no Brasil é de adaptação muito difícil. Por aqui, existem muitas plantas chamadas popularmente de arnica, mas na verdade são espécies diferentes (Figura 2) e não têm a mesma aplicação terapêutica. Desde a Idade Média, os efeitos antinflamatórios da *Arnica montana* L. são conhecidos, bem como sua aplicação na cicatrização de ferimentos graças às suas propriedades regeneradoras de tecidos (VALENTOVA, 1990).

A

B

C

Figura 2- Exemplos de plantas conhecidas popularmente como Arnica. A) *Arnica montana* Linné; B) *Lychnophora ericoides* Less; C) *Heterotbeca inuloides* Cass.

Arnica montana Linné pertence à família das Asteraceae e apresenta como sinonímia *Caltha alpina, Chrysanthemun latifoliun, Doronicum austricum quartum, Nardus celtica, Panacea lepsorum, Ptarnica Montana*. Popularmente, a arnica recebeu diversos nomes: quina-dos-pobres, tabaco-dos-alpes, tabaco-da-montanha, erva-dos-pregadores, veneno de leopardo, etc (VESSLY, 2000).

Arnica montana é um arbusto perene com rizomas (caules subterrâneos) e raízes perenes, com caules (talos) aéreos que se renovam a cada ano. Sua altura varia de 20 a 70 cm. As folhas chegam a ter 7cm de comprimento com quatro folhas ovais agrupadas em roseta. As flores são abundantes, de cor amarelo-ouro ou alaranjada, com pétalas ovaladas e pontudas que exalam um suave perfume. Os frutos são pardos e aquênio (LASRWAL, 1998).

A arnica é o grande remédio do traumatismo, com ação sobre músculos, tecido celular, cérebro e vasos sanguíneos (partes do corpo mais sujeitas a traumatismos), está indicada para tratar machucados, contusões musculares, artrite, dores reumáticas, no tratamento das varizes e no pós-operatório por reduzir o edema. Em aplicações mais específicas, é também indicada para combater febres, hemorragias, desinterias, infecções

renais, inflamações oculares, problemas circulatórios e cardíacos. No tratamento à oleosidade e queda excessiva dos cabelos, rachaduras e hematomas na pele; o uso externo de tinturas e cataplasmas de arnica está limitado à pele íntegra.

A variedade dos produtos a base de arnica existentes no mercado explica a diversa empregabilidade desta planta, como sabonetes para limpeza de partes contundidas, conservando a pele macia e elástica, fazendo desaparecer as rachaduras e asperezas; pasta dental e água dentifrícia; óleo tônico capilar; óleo e pomada para fricção muscular; etc.

Apresenta em sua composição química lactonas sesquiterpênicas como helenalina sob a forma de ésteres (acetato, metacrilato, isobutirato) e dihidrohelenalina, seus ésteres (arnicolídeos) e tetrahidrohelenalina. Além de flavonóides, óleo essencial que contém timol e derivados como timolmetileter, hidroxitimolmetileter e o isobutirato de timol, ácidos fenólicos, polifenóis, ácido cafeico (Figura 3) e um complexo formado por caroteno e manganês (POZETTI, 1991).

A eficiência da arnica para tratar ferimentos, especialmente aqueles com hematomas, é comprovada pela presença de uma substância chamada quercetina (Figura 4), capaz de aumentar a resistência dos vasos e a irrigação sangüínea nos locais feridos, diminuindo o coágulo e eliminando o hematoma. Outra substância, a inulina, funciona como um analgésico, aliviando a dor.

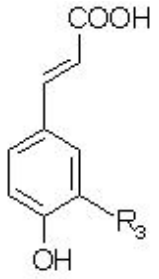

Figura 3 –Estrutura química do ácido cafeico. R_3=OH

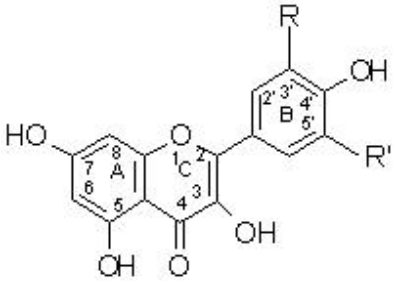

Figura 4 –Estrutura química da quercetina. R=OH e R' =H

1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A inflamação é fundamentalmente uma resposta de defesa do organismo, visando destruir, amenizar ou circunscrever a ação do agente agressor. Nesse processo encontramos o macrófago em estado ativado, onde sua capacidade de fagocitar e exercer atividades antimicrobianas e citotóxicas está aumentada por sofrer uma série de alterações morfo-funcionais (ROITT et al.,1999; SELIGMANN, 2003).

A interação celular entre macrófagos e linfócitos durante a resposta imunológica desencadeia nos macrófagos, mudanças bioquímicas e alterações na expressão de genes, por estímulos inflamatórios sucessivos à membrana macrofágica; alterando suas propriedades de locomoção, aderência, fagocitose e de síntese de enzimas e substâncias antimicrobianas, citotóxicas, pró-inflamatórias, vasodilatadoras e imunomoduladoras. (NATHAN & HIBBS, 1991).

Em resposta à ativação por mediadores inflamatórios, os macrófagos aumentam o seu conteúdo enzimático e a secreção de produtos biologicamente ativos no meio extracelular, liberando mais de 100 compostos; entre os numerosos produtos secretados, além de várias citocinas, estão também compostos inorgânicos com alto grau de reatividade química como os intermediários reativos do oxigênio (ROI), incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do nitrogênio (RNI), incluindo o óxido nítrico (NO) (BABIOR, 1978; FRIEDL et al., 2004).

O ânion superóxido (O_2^-), produzido a partir da redução do oxigênio, é subseqüentemente convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com a ajuda da enzima superóxido dismutase (SOD). Nos locais de atividade fagocítica e inflamação, quando há biossíntese excessiva, o H_2O_2, em altas concentrações, pode destruir estruturas biológicas, ocasionando lesões irreversíveis como a quebra de fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana, levando à morte celular (PICK & KEISARI, 1980; HAMPTON et al., 1998).

No processo inflamatório, os macrófagos ativados sintetizam nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), formas estáveis oxidadas do NO, cuja produção reflete o grau de inflamação, e conseqüentemente indica uma medida dos efeitos de drogas na terapia antiinflamatória. O óxido nítrico é formado através da oxidação do átomo de nitrogênio do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que é dependente dos cofatores NADPH, FMN, FAD, Ca^{+2} e tetrahidrobiopterina (BH_4), formando como reação intermediária a N^G-Hidroxil-L-arginina e como produtos finais a L-citrulina e o NO (IYENGAR et al., 1987).

O óxido nítrico (produto celular) é um radical livre altamente solúvel que exerce efeito fisiológico e proteção imunológica. Está envolvido em uma ampla série de

processos fisiológicos: como fator de relaxamento derivado do endotélio concede resistência vascular e controle da pressão sanguínea, diminui a resistência renal e aumenta a filtração glomerular; também transmite os sinais nervosos de um neurônio a outro em diversas áreas do cérebro, além de atuar como vasodilatador nas terminações nervosas parassimpáticas do pênis, produzindo a ereção e possivelmente pode também estar envolvido em alguns dos mecanismos de memória (RANG et al., 1997; XIE et al., 2002).

Como molécula reguladora no sistema imunológico, o NO sinaliza em diversos tecidos, é um mediador citotóxico/citostático para as células tumorais e agentes infecciosos intracelulares, contribuindo para a manutenção da homeostasia imunológica, devido ao seu papel no fenômeno de supressão da célula T (MONCADA et al., 1991).

A produção de NO por diferentes células durante a resposta imunológica é controlada por diversos mecanismos (BASU, 2006). Em adição ao papel protetor do NO, há um mecanismo dependente da liberação de citocinas com função autócrina, tal como o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e parácrina, como o interferon-γ (IFN-γ), que regulam a ativação de macrófagos, modulando sua função fagocitária e a síntese de mediadores pró-inflamatórios, assim como também a indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (NUSSLER & BILLIAR, 1993).

A expressão da isoforma NO induzível pode ocasionar na superprodução de NO, que exerce efeitos citotóxicos potentes em células normais por afetar o metabolismo energético, alterando o sistema redox e danificando o DNA, implicando assim, em patologias imunoinflamatórias em que altos níveis deste óxido são tecido-destrutivos (VANE et al., 1994).

O NO é altamente reativo e reage com muitas macromoléculas e, também, com o ânion superóxido (O_2^-) (produto do sistema de redução do oxigênio), formando o radical peroxinitrito ($ONOO^-$), um oxidante potente que medeia alguns dos efeitos citotóxicos do NO em locais de atividade fagocítica e inflamação, quando há biossíntese excessiva (ABBAS et al., 2000). O NO aumenta a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio, esses radicais reagem entre si, podendo formar outros oxidantes com capacidade para nitrar resíduos fenólicos de proteínas, como a enzima succinato desidrogenase e conduzir à disfunção mitocondrial (PODEROSO et al., 1998).

A capacidade dos macrófagos ativados em liberarem mediadores tóxicos consome grandes quantidades de energia e muitas vezes provocam dano tecidual, mas é importante na defesa do hospedeiro porque lhe permite destruir grandes patógenos extracelulares que não consegue ingerir. A estreita regulação da atividade dos macrófagos pelas células Th1 possibilita a distribuição específica e efetiva desse potente meio de defesa do hospedeiro, ao mesmo tempo em que minimiza a agressão tecidual e o consumo de energia (JANEWAY et al., 2000).

A ativação dos macrófagos requer um sinal indutivo inicial a partir de linfócitos T, identificado como IFN-γ que particularmente em combinação com a interleucina-2 (IL-2) e/ou TNF-α, participam do mecanismo que desencadeia a produção de NO. Por outro lado, o próprio NO atua como um inibidor da produção das citocinas liberadas pelas células Th1 (TNF-α, IL-2, IL-12 e IFN-γ), ou seja, o NO é capaz de inibir a sua própria produção, por interferir na liberação das citocinas que promovem a sua produção. Efeito esse não observado sobre as células Th2 que liberam principalmente TGF-β, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, sugerindo que este mecanismo de regulação pode, em alguma

circunstância, modular a resposta imune, contribuindo para a manutenção da homeostasia imunológica (BINGISSER et al., 1998).

Citocinas são frequentemente agrupadas em famílias de acordo com suas funções similares ou de acordo com a sua estrutura proteica (HOLLOWAY, 2001). São elas as hematopoietinas, os interferons (IFN), as quimiocinas, e a família do fator de necrose tumoral (TNF). Membros da família TNF atuam como trímeros, a maioria dos quais ligados à membrana e muito distintos das outras citocinas por suas propriedades. Apesar disso, eles compartilham algumas propriedades importantes com as citocinas solúveis: eles são sintetizados de novo no momento do reconhecimento do antígeno pela célula T, afetando o comportamento da célula-alvo (JANEWAY et al., 2000).

A partir do perfil das células Th0 existe uma dicotomia que se efetua seja no sentido de um perfil Th1, seja no sentido de um perfil Th2. O perfil Th1 está essencialmente implicado na resposta imunológica celular caracterizada por um infiltrado rico em neutrófilos e em macrófagos e pela formação de granulomas. O perfil Th2 está implicado nas respostas imunológicas alérgicas e é caracterizado por infiltrados ricos em eosinófilos e pelo aumento da síntese da IgE (REINHERZ & SCHOLOSSMAN, 1981).

TNF-α, produzido por macrófagos, é uma citocina que apresenta efeito estimulante no crescimento de fibroblastos, aumenta a capacidade do interferon-γ em induzir a expressão de antígeno em algumas células tumorais, suprime a atividade da lipase lipoproteica, ativa neutrófilos, ativa células Natural Killer (NK) em humanos e facilita a proliferação de células B humanas (SHALABY et al., 1985).

O TNF-α estimula os fagócitos mononucleares a secretarem quimiocinas que contribuem para a resposta inflamatória. O TNF reduz a perfusão tecidual por relaxar o tônus da musculatura lisa vascular, atuando diretamente sobre as células dos músculos lisos e por agir também na produção de vasodilatadores como o NO, por indução da NOS. Diversas ações específicas do TNF-α podem contribuir para seus efeitos letais nas concentrações extremamente elevadas. A super produção de TNF-α em vários processos inflamatórios agudos, causa disfunção em órgãos como o fígado; por outro lado, a diminuição nessa produção ou a neutralização da ação do TNF-α ou da IL-12 e IFN-γ leva a um aumento na suscetibilidade para infecções (GANTINER et al., 1996).

A interleucina-12 (IL-12), descoberta em 1989, é um heterodímero que apresenta em sua estrutura cadeias polipeptídicas, a p-40 e a p-35. A IL-12 é liberada por células B ativadas, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e macrófagos.

A atividade de IL-12 abrange múltiplos efeitos sobre as células NK (proliferação celular, liberação de citocinas e aumento da citotocixidade) e exerce importante função na ativação da resposta Th1(resposta imune-celular) por favorecer a diferenciação das células Th em Th1, com conseqüente indução da produção de IFN-γ. IFN-γ é um importante mediador na resistência viral, fúngica, bacteriana e parasitária, por estimular as funções efetivas dos macrófagos nos momentos iniciais da invasão do patógeno, controlando rapidamente a infecção (TRINCHIERI, 1995).

Estudos recentes demonstram que a IL-12 é uma chave promotora da imunidade celular e da resistência inicial a infecções, um potente estimulador da defesa do organismo contra uma variedade de patógenos. A síntese de IL-12 pode resultar em uma resposta excessiva do sistema imunológico, causando dano tecidual e morte, como

observado em doenças autoimunes e no choque séptico. Identificar e caracterizar os produtos envolvidos na indução e na inibição da síntese de IL-12 é uma importante área de investigações constantes que possibilita a produção de imunoterápicos.

A interleucina-12 (IL-12) é o principal mediador da resposta imune inata a microorganismos intracelulares e um indutor chave da imunidade mediada por células, a resposta adaptativa contra estes microorganismos. É produzida principalmente por macrófagos ativados e células dendríticas (GAZZINELLI *et al.*, 1993). É uma proteína heterodimérica composta por duas subunidades denominadas p35 e p40 (o que representa aproximadamente seus pesos moleculares).

A IL-12 é muito importante para a iniciação de uma seqüência de respostas envolvendo macrófagos, células NK e linfócitos T, e participa de uma ligação importante entre a imunidade natural e adaptativa. A IL-12, juntamente com o TNF-α, são co-estimuladores para a produção de IFN-γ (TRIPP et al., 1993), direcionando para uma resposta Th1.

Na rede de mediadores que constitui a resposta imunológica, o IFN-γ, produzido pelos linfócitos, é a principal citocina ativadora de macrófagos e possui funções essenciais na imunidade inata e na imunidade específica mediada por células. O IFN-γ aumenta a ação microbicida de macrófagos pela estimulação da síntese de intermediários reativos do oxigênio e de óxido nítrico (DRAPIER et. al., 1988).

As células Th1 possuem marcadores de membrana CCR5 e LAK3 e as Th2 possuem o CCR3, elas apresentam função regulatória uma sobre as outras. O IFN-γ inibe a expressão das citocinas produzidas por células Th2 (FUSS & STROBER, 1998).

A regulação dos perfis Th1/Th2 ainda é pouco conhecida, existe um equilíbrio com sobreposição dos dois perfis, pois um perfil Th1 pode estar implicado em uma resposta alérgica e um perfil Th2 pode provocar a formação de granulomas. Existe também um equilíbrio entre as citocinas inflamatórias e as antiinflamatórias (SALEM, 2005).

A IL-6, liberada pelos macrófagos, é uma citocina multifuncional, envolvida na regulação da resposta imune, na hematopoese, na inflamação (AKIRA et al., 1990), na produção de plaquetas, na ativação dos osteoclastos, na produção de imunoglobulinas, na diferenciação de células T e de células neuronais, na proliferação de queratinócitos e das células mesangiais (NAKA et al., 2002); tem funções tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (TRIPP et al., 1993). A IL-6 foi originalmente identificada como fator de diferenciação das células B e uma de suas principais funções é a indução da produção de anticorpos por estas células (AKIRA et al., 1990).

A IL-1 é produzida por macrófagos ativados e atua juntamente com o TNF-α como um mediador da resposta inflamatória e da imunidade inata. Existem duas formas de IL-1, denominadas de IL-1α e IL-1β, que têm homologia de menos de 30% entre si, mas ligam ao mesmo receptor celular e medeiam as mesmas atividades biológicas. Também atua como pirogênio endógeno (DINARELLO, 1988). A IL-1 é o protótipo de citocina multifuncional. É uma citocina pró-inflamatória potente, que pode gerar a síntese de PGE_2, atua em células B ativadas por antígenos para induzir sua proliferação e/ou diferenciação em células produtoras de anticorpos, sinergisticamente com outros fatores como IL-6 e IL-2 (AKIRA et al., 1990).

A ativação dos macrófagos é um fenômeno complexo e quando ativados apresentam capacidade aumentada de destruir certos microrganismos. Os macrófagos respondem a vários microrganismos pela secreção de IL-12, que induz a produção local de IFN-γ pelas células NK e linfócitos T. O IFN-γ ativa os macrófagos a destruir os microrganismos fagocitados por estimular a síntese de intermediários reativos do nitrogênio e oxigênio (STARK et al., 1998).

A importância do sistema imunológico para a sobrevivência humana, aliada à grande utilização de plantas medicinais pela população e à procura de substâncias naturais pelas indústrias farmacêuticas motivam o desenvolvimento de estratérgias, tanto químicas quanto biológicas, para a descoberta de novas substâncias ativas.

II - OBJETIVOS

Devido à ampla empregabilidade de *Arnica montana* tanto como medicamento fitoterápico, como homeopático no tratamento de diversas patologias, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a resposta imunológica frente as preparações fitoterápicas e homeopáticas de arnica a partir de sua tintura-mãe e ainda, avaliar o cultivo de macrófagos como modelo biológico para o estudo de outros medicamentos homeopáticos.

Os objetivos específicos são:

- Determinar a citotoxicidade de *Arnica montana* L.
- Avaliar a resposta do efeito das dinamizações homeopáticas 6CH, 12CH e 30CH da arnica sobre culturas de macrófagos e, de células esplênicas de camundongos, através da determinação de citocinas (TNF-α, IFN-γ, IL-1, IL-4, IL-6 e IL-12) e dos reativos intermediários de oxigênio (H_2O_2) e de nitrogênio (NO).
- Caracterizar uma atividade moduladora dos mecanismos de amplificação e/ou supressão dessa resposta.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Arnica montana*

As preparações dos medicamentos homeopáticos 6CH, 12CH e 30CH seguiram rigorosamente a 2ª edição da Farmacopéia Homeopática Brasileira de 1997. (ver anexo) Através de múltiplos frascos para as diluições e o emprego das 100 sucussões manuais ou mecânicas, obtém-se a dinamização e a cada etapa concluída, uma potência. Para as três primeiras dinamizações, para a escala centesimal, foi empregado etanol com o mesmo título etanólico da tintura-mãe. E, para as preparações intermediárias, assim como para as de estoque, foi empregado etanol 70% (p/p). Para as potências aqui estudadas, 6CH, 12CH e 30CH foi utilizado etanol 5% (p/p).

As preparações fitoterápicas foram obtidas por diluições em meio de cultura RPMI-1640, a partir da tintura-mãe AM1, obtendo-se AM2 (1:2), AM3 (1:10), AM4 (1:100), AM5 ($1:10^4$), AM6 ($1:10^6$), AM7 ($1:10^{12}$), AM8 ($1:10^{24}$) e AM9 ($1:10^{60}$).

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 25 e 30 gramas com 6-8 semanas de idade, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Os animais receberam ração e água *ad libitum*, mantidos em gaiolas com condições estáveis de ambiente 23°C, ±56% de umidade relativa do ar e ciclos de 12 horas claro/escuro.

3.3. Obtenção das células do Exsudato Peritoneal (PEC)

Os animais foram inoculados previamente com 3,0 mL de tioglicolato de sódio (Difco) a 3%, por via intraperitoneal, 3 dias antes da coleta das células. Após 72 horas de estímulo, os animais foram mortos individualmente através da inalação de clorofórmio, e seu peritôneo exposto, em fluxo laminar horizontal (Veco), para a retirada do lavado peritoneal, injetando 5 mL de tampão fosfato (PBS) estéril, pH 7,0 a 4 ^{o}C, na porção mediana superior do abdomem, após leve massagem manual. O material obtido foi dispensado em tubo cônico estéril (Corning, Inc.) para o preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes, sucessivamente, com 5 mL de PBS em centrífuga (Fanem) a 200 x g/5 minutos. As células foram ressuspendidas em RPMI-1640 (Sigma) contendo 5% de soro fetal bovino, 2-Mercaptoetanol a $2x10^{-5}$ M, Penicilina 100 U/mL, Estreptomicina 100 U/mL e L-Glutamina 2mM; designado como meio completo RPMI-1640-C. Para contagem celular, 10µL da suspensão celular foi diluída em 90µl de líquido de Lazarus em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany). A suspensão celular foi ajustada à concentração de $2x10^{6}$ células/mL para a determinação do peróxido de hidrogênio ou a $5x10^{6}$ células/mL de RPMI-1640C para os demais testes.

3.4 Obtenção das células esplênicas

Os animais foram mortos individualmente através da inalação de clorofórmio, e seu peritôneo exposto, em fluxo laminar horizontal (Veco), para a retirada do baço que foi pinçado em placa de Petri estéril contendo 3,0 mL de BSS (Balanced Salt Solution), pH 7,0 a 4 ^{o}C. O material obtido foi dispensado em tubo cônico estéril (Corning, Inc.) para o preparo da suspensão celular. As células esplênicas foram lavadas 3 vezes com 5 ml de BSS em centrífuga (Fanem) a 200 x g/5 minutos. As células foram resuspendidas em RPMI-1640 (Sigma) contendo 5% de soro fetal bovino, 2-Mercaptoetanol a $2x10^{-5}$ M, Penicilina 100 U/ml, Estreptomicina 100 U/ml e L-Glutamina 2mM, designado como meio completo RPMI-1640-C. Para contagem celular, em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany), foi utilizado azul de Trypan 0,04%. A suspensão celular foi ajustada à concentração de $5x10^{6}$ células/mL para a determinação do IFN-γ e da IL-4.

3.5 Determinação da viabilidade celular

O potencial tóxico das preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana* L., foi determinado segundo a capacidade que têm as células vivas de clivar o anel tetrazólio presente no sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983). Após o contato por 24 horas de 100µL da cultura de macrófagos peritoneais a $5x10^{6}$ células/mL (item 3.3) com 100µl de cada preparação medicamentosa de *Arnica montana* L. (6CH, 12CH, 30CH, AM1, AM2, AM3, AM4, AM5,

AM6, AM7, AM8 e AM9), o meio livre de células (MLC) foi desprezado e 100µl de uma solução de MTT a 0,5mg/mL diluído em RPMI-1640 foram adicionados à placa de cultura e incubados por 3 horas em estufa (Forma Scientific, Inc.) com tensão constante de 5% de CO_2 a 37°C ± 1°C. Após incubação, os cristais de formazana formados pelas células viáveis foram solubilizados com 100µL de isopropanol. A leitura da absorbância foi feita a 540nm, utilizando um filtro de referência de 620nm, em espectrofotômetro UV/visível automático (Multiskan Ascent, Labsystems).

3.6 Determinação da Liberação do Peróxido de Hidrogênio

A produção de H_2O_2 foi determinada segundo o método descrito por Pick & Keisari (1980), e adaptado por Pick & Mizel (1981).

A suspensão de células do exsudato peritoneal foi ajustada na concentração de $2x10^6$ células /ml em solução de vermelho de fenol 0,56 mM; peroxidase de raiz forte, tipo II (0,01 mg/mL, Sigma); tampão fosfato de potássio 10 mM a pH 7,0; NaCl 140 mM e dextrose 5,5 mM.

Dessa suspensão celular, 100µL foram transferidos para as escavações de uma placa de cultura de fundo plano com 96 cavidades (Corning, Inc.). A seguir foram acrescentados 50µl das preparações medicamentosas de *Arnica montana* L. a serem testadas. As amostras foram ensaiadas em quadruplicata para cada animal, com controle negativo constituído somente por meio RPMI – 1640-C e com controle positivo contendo 50 µl de zymosan a 10mg/ml (parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisae).* A placa foi incubada por uma hora a 37°C ± 1°C em atmosfera úmida com tensão constante de 5%

de CO_2. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de NaOH 5 N. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA automático, com filtro de 620 nm, contra branco constituído de solução de vermelho de fenol e NaOH 5 N.

Os resultados foram expressos em nanomoles de $H_2O_2/2x10^5$ células peritoneais/cavidade, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho de fenol.

Para a determinação do efeito inibitório da produção de H_2O_2 foram utilizadas as células do exsudato peritoneal na concentração de 2 x 10^6 células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados na presença de 50µL de Phorbol Myristate Acetate (PMA) (0,2µM) e 50µL das preparações fitoterápicas e homeopáticas, durante 1 hora em estufa à 37°C± 1°C com tensão constante de 5% de CO_2. A produção de H_2O_2 foi medida espectrofotometricamente através do método de Pick e Keisari (1980) como descrito anteriormente.

3.7 Determinação da Liberação de Óxido Nítrico

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito (NO_2^-) em meio de cultura, medido espectrofotometricamente usando o reagente de Griess (GREEN et al., 1982), composto por dicloro N-(1-Naftil)-etilenodiamino (Merck), sulfanilamida (Merck) e ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical). Da suspensão de células do exsudato peritoneal ajustada a $5x10^6$ células/ml de RPMI – 1640-C, foram retirados 100µl e acondicionados em placa estéril de fundo plano com 96 cavidades (Corning, Inc.). A seguir foram acrescentados 100µl das preparações medicamentosas de *Arnica montana* L. a serem

testadas. Em outras cavidades foram adicionados 100µl da solução de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* sorotipo 0111:B4 a 10µg/ml (Sigma) como controle positivo, ou 100µl de meio RPMI-1640-C como controle negativo.

A placa foi incubada em estufa (Forma Scientific, Inc.) a 37 ^{0}C ± 1°C com tensão constante de 5% CO_2 por 24 horas. Após esse período foram transferidos 50µL de MLC para uma nova placa e adicionados 50 µL do reagente de Griess.

Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a leitura foi feita em espectrofotômetro UV/visível automático (Multiskan Ascent, Labsystems), com filtro de 540 nm. Os resultados foram expressos em micromoles de NO/5x10^5 células peritoneais/orifício, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de $NaNO_2$ (Merck) em RPMI – 1640.

Para a realização do teste de inibição da produção de NO, foram utilizadas as células do exsudato peritoneal, na concentração de 5 x 10^6 células/mL. Após a aderência, os macrófagos foram incubados em presença de 100µL de solução de LPS (1µg/mL) e 100µL das preparações fitoterápicas e homeopáticas. A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 37^{o}C ± 1°C com tensão constante de 5% de CO_2. A produção de NO foi medida espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito no meio de cultura com a utilização do reagente de Griess de acordo como descrito anteriormente.

3.8 Determinação da liberação de citocinas

A partir das suspensões de células peritoneais e esplênicas ajustadas a $5x10^6$ células/ml, obtidas conforme itens 3.3 e 3.7, foram distribuídas alíquotas de 1,0 mL em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades e adicionado 34 µl de cada preparação medicamentosa ou do controle positivo (LPS a 10 µl/mL ou ConA a 0,5 µg/mL) ou ainda de meio de cultura como controle negativo. As placas foram incubadas em estufa (Forma Scientific, Inc.) a 37 ^{0}C com tensão constante de 5% CO_2 por 24 horas. Após esse período, as placas sofreram centrifugação refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C por 10 min a 4000 rpm. Os sobrenadantes obtidos foram aliquotados em ependorffs e armazenados em frezzer -80°C para posterior dosagens das citocinas.

As citocinas IFN-γ e IL-4 foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células esplênicas e as citocinas TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-12 (p-40) foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células peritoneais, através do teste imunoenzimático ELISA (Kit DuoSet®, R&D Systems) de captura para cada citocina.

As placas de 96 cavidades (Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, Va) foram adsorvidas com um anticorpo de captura monoclonal, obtido de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em solução salina tamponada de fosfatos, pH 7,2 (PBS) (100 µl/cavidade) e incubadas "overnight" à temperatura ambiente. Após este período as placas foram lavadas com solução salina tamponada de fosfatos, pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 300 µl/cavidade de soro albumina bovina (BSA) a 1% em PBS (PBS/BSA), à temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T. Após lavagem foram adicionados 100 µL do padrão de

citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente novamente por 120 minutos, lavadas 3 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 µl do anticorpo monoclonal anti-citocina de camundongo marcado com biotina (1,5 µg/cavidade; Phar Mingen) diluído à concentração adequada para cada citocina em diluente de reagente (1% BSA, 0,05% tween 20 em PBS, pH 7,2). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T e adicionados 100 µl/cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina diluído 1/200 em diluente reagente e as placas foram incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 minutos. Após este tempo as placas foram então lavadas 3 vezes com PBS-T e em seguida foi adicionado 100µl do substrato (tetrametilbenzidina a 0,4 mM em tampão fosfato cítrico 10 mM, pH 5,5 e 1,2 mM de H_2O_2) a cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50µl de H_2SO_4 2N em cada cavidade. A absorbância foi lida a 450nm em espectrfotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems), e as concentrações das citocinas foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões de cada citocina, obtendo os resultados em pg/mL.

3.9 Análise estatística

Todos os resultados obtidos nesse estudo foram submetidos à análise estatística. Para a análise neste trabalho, utilizou-se média de cinco animais divididos em experimentos independentes. O programa estatístico Microcal Origin 5.0 foi utilizado através do teste-*t* de Student para amostras não paramétricas em todos os testes, considerando o nível de significância de 5% (α=0,05) para pesquisas biológicas, ou seja, as diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

Os resultados foram expressos como média±desvio padrão de no mínimo cinco experimentos realizados em triplicatas para a análise da produção de todas as citocinas e compostos reativos.

IV - RESULTADOS

4.1 Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada em células do exsudato peritoneal de camundongos. As células foram mantidas em cultivo por 24 horas em meio de cultura RPMI-1640C. Os resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade como média ± desvio padrão de 5 animais.

A Figura 6 mostra que as três primeiras diluições da tintura-mãe de *Arnica montana* L. AM1, AM2 e AM3 apresentam elevada citotoxicidade, apresentando índices baixos de viabilidade celular quando comparadas ao controle negativo de meio RPMI-1640C (100%). A porcentagem de viabilidade dos macrófagos em contato com a tintura-mãe de *Arnica montana* L. *(*AM1) foi de apenas 5%; as diluições seguintes AM2 (1:2) e AM3 (1:10) ainda apresentaram citotocixidade, onde 8% e 29% dos macrófagos permaneceram viáveis na presença dessas diluições, respectivamente. Enquanto que as demais preparações fitoterápicas AM4 (1:100), AM5 ($1:10^4$), AM6 ($1:10^6$), AM7 ($1:10^{12}$), AM8 ($1:10^{24}$) e AM9 ($1:10^{60}$) obtiveram índices entre 69% a 98% de viabilidade. Entretanto, todas as preparações homeopáticas apresentaram índices altos de viabilidade, todos superiores a 96% como mostrados na Figura 7.

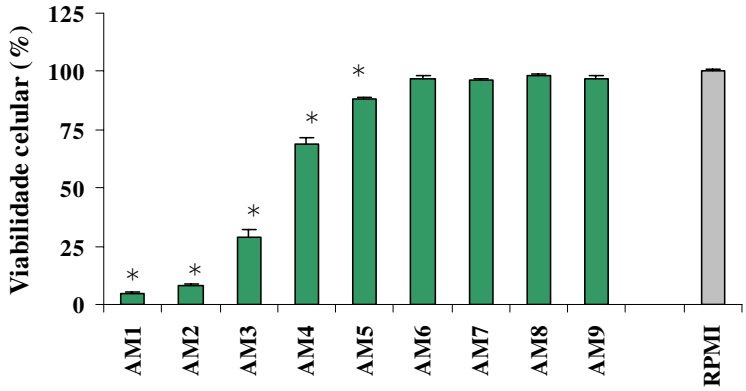

Figura 6 – Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss frente às preparações fitoterápicas de *Arnica montana* L. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença das diluições (AM1, AM2, AM3, AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9) provenientes da tintura-mãe de *Arnica montana.* RPMI equivale a 100% de viabilidade. Os valores obtidos referem-se a 5 experimentos realizados em triplicata e expressos em percentual (%) como média ± desvio padrão.
*p<0,05 comparado com o RPMI.

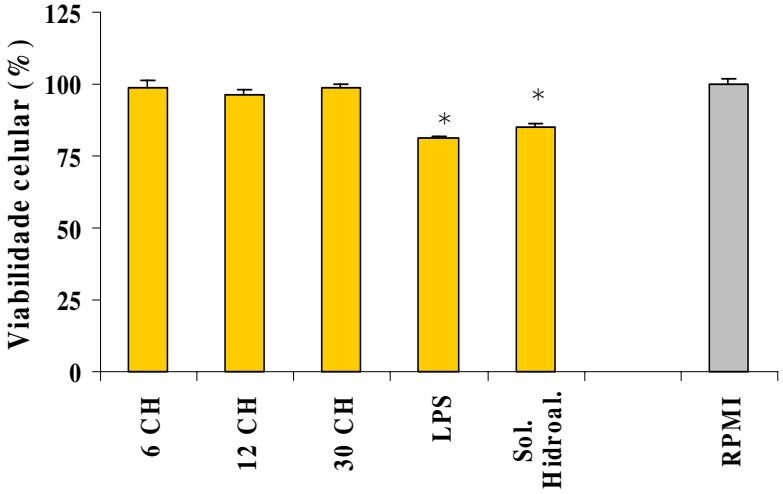

Figura 7 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss frente às preparações homeopáticas de *Arnica montana.* As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença das preparações homeopáticas (6CH, 12CH e 30CH) provenientes da tintura-mãe de *Arnica montana* L., ou na presença de LPS, bem como do meio RPMI contendo 5% de álcool etílico. Os valores obtidos referem-se a 5 experimentos realizados em triplicata e expressos em percentual (%) como média ± desvio padrão.
*p<0,05 comparado com RPMI.

4.2 Determinação de H_2O_2

A determinação da liberação de peróxido de hidrogênio H_2O_2 foi realizada em sobrenadantes obtidos da cultura de células do exsudato peritoneal, após 1 h de incubação com as preparações fitoterápicas (AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9) e homeopáticas (6CH, 12CH e 30CH) obtidas de *Arnica montana* L., onde o controle negativo é constituído por solução de vermelho de fenol e o controle positivo por zymosan a 10μg/ml.

Embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) proveniente da explosão oxidativa mitocondrial dos macrófagos realize papel fundamental na atividade bacteriana destas células; as células do exsudato peritoneal dos camundongos Swiss em contato com as preparações fitoterápicas e homeopáticas não apresentaram capacidade de produção de H_2O_2 quando comparado ao zymosan (157,63 ± 12,91), dados mostrados na Figura 8. A Figura 9 também mostra que nenhuma das preparações fitoterápicas e homeopáticas exerceram influência na produção do peróxido de hidrogênio induzido pelo PMA.

Foram calculadas as porcentagens de inibição, através de comparação com o controle positivo, nos experimentos onde as preparações fitoterápicas e homeopáticas apresentaram efeitos inibitórios sobre a produção de H_2O_2. A equação abaixo foi utilizada para o cálculo:

% inibição = 100 – (A . 100/B), onde A é o valor obtido pela preparação teste e B representa o valor obtido pelo controle positivo da reação.

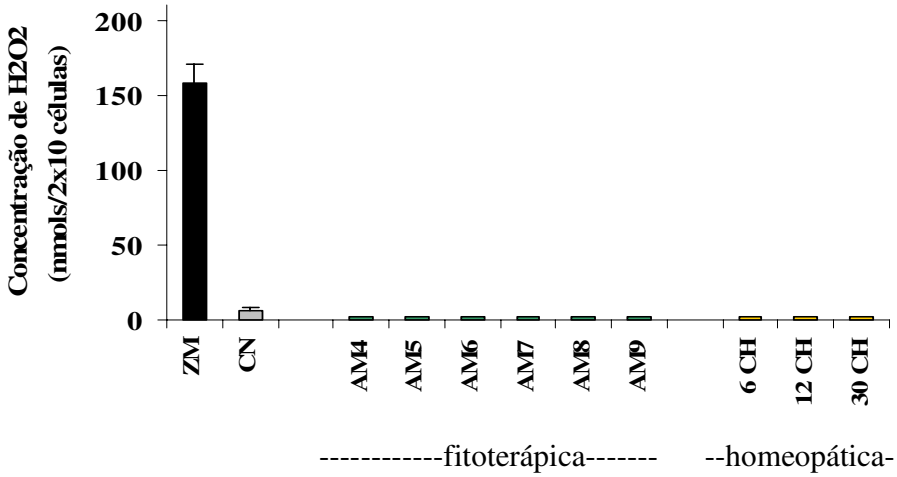

Figura 8- Produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana* L. As células peritoneais obtidas de camundongos Swiss foram cultivadas em placas de microtitulação. Como controle positivo usou-se zymosan (ZM a 10µg/ml). A concentração de H_2O_2 foi obtida através de uma reta padrão previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em nmols como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos. $p<0,05$ comparado ao ZM.

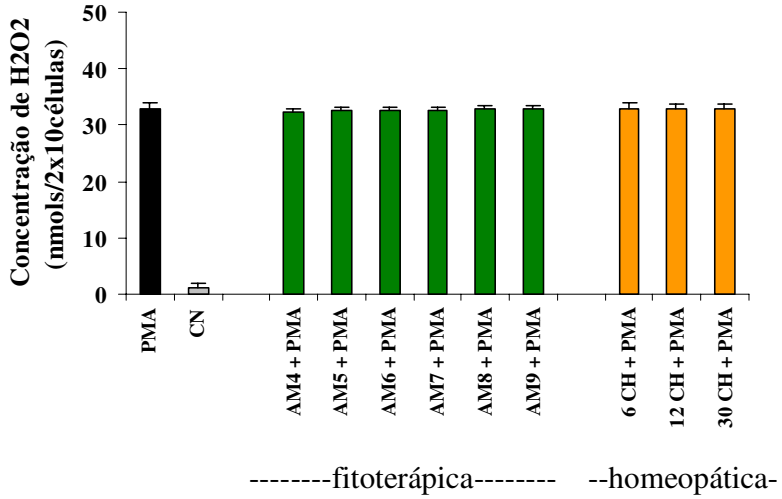

Figura 9- Verificação do efeito inibitório da produção de peróxido de hidrogênio por células do exsudato peritoneal cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana* L. As células peritoneais obtidas de camundongos Swiss foram cultivadas em placas de microtitulação. Como controle positivo usou-se o PMA 0,2µM. A concentração de H_2O_2 foi obtida através de uma reta padrão previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em nmols como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos $p<0,05$ comparado ao PMA.

4.3 Determinação de NO

A determinação do NO pelo reagente de Griess foi realizada em sobrenadantes obtidos da cultura de células do exsudato peritoneal com as preparações fitoterápicas (AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9) e homeopáticas (6CH, 12CH e 30CH) obtidas de *Arnica montana* L., onde o controle negativo é constituído por meio RPMI-1640C e LPS 10μg/ml como controle positivo da reação. Das preparações fitoterápicas, apenas AM4 (32,09±0,97), AM5 (29,21±0,87) e AM6 (11,49±0,43) foram capazes de promover liberação de óxido nítrico, com valores significativos quando comparado ao LPS (67,07 ± 3,63) (Figura 10).

A Figura 11 mostra que não houve liberação de NO pelas preparações homeopáticas 6CH, 12CH e 30CH, mas quando em adição ao LPS foram capazes de reduzir a produção de NO em 13,91%; 11,85%; 7,26%; respectivamente em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos (Tabela 1).

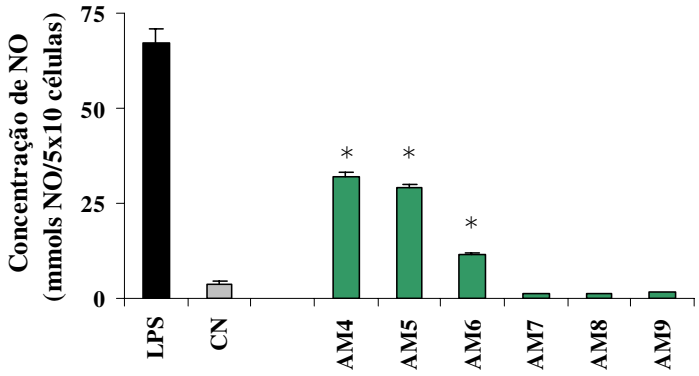

Figura 10- Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal cultivadas com preparações fitoterápicas de *Arnica montana* L. As células peritoneais obtidas de camundongos Swiss foram cultivadas em placas de microtitulação. O meio RPMI-1640-C foi usado como controle negativo da reação (CN), como controle positivo usou-se LPS a 10µg/ml. A concentração de NO foi obtida através de uma reta padrão previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em µmols como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos.
*p<0,05 comparado ao LPS

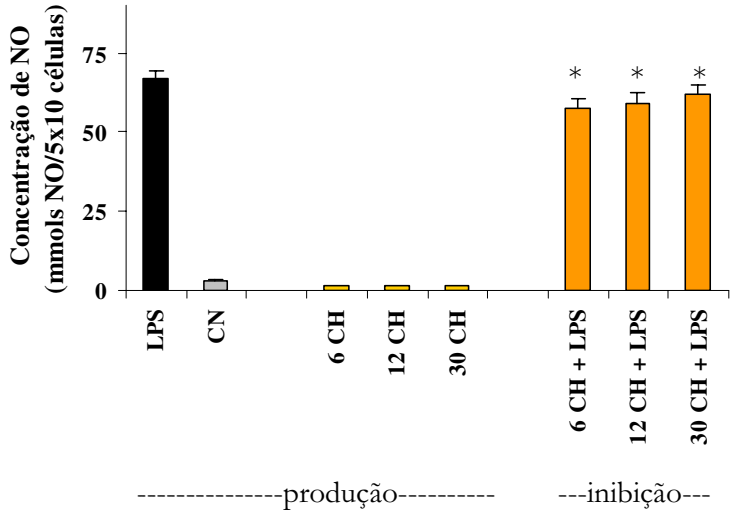

Figura 11- Produção e inibição de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal cultivadas com preparações homeopáticas de *Arnica montana*. As células peritoneais obtidas de camundongos Swiss foram cultivadas em placas de microtitulação com meio RPMI-1640-C, usado também como controle negativo da reação (CN). Como controle positivo usou-se LPS a 10µg/ml. A concentração de NO foi obtida através de uma reta padrão previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em µmols como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos. * p<0,05 comparado ao LPS

Tabela 1. Efeito inibitório das preparações homeopáticas de *Arnica montana* na produção de NO em cultura de macrófagos estimulados por LPS.

Preparações	média ± desvio padrão[a]	% de inibição
RPMI + LPS	67,07 ±3,63	0
6CH + LPS	57,74 ±2,61	13,91%
12CH + LPS	59,12±3,25	11,85%
30CH + LPS	62,20± 2,68	7,26%

[a]$p<0,05$ comparado à média ± desvio padrão de LPS (67,07±3,63)

Foram calculadas as porcentagens de inibição, através de comparação com os controles, nos experimentos onde as preparações homeopáticas apresentaram efeitos inibitórios sobre a produção de NO. A equação abaixo foi utilizada para o cálculo:

% inibição = 100 – (A . 100/B), onde A é o valor obtido pela preparação teste e B representa o valor obtido pelo controle positivo da reação.

4.4 Determinação de TNF-α

A determinação do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-α) foi realizada em sobrenadantes obtidos da cultura de células do exsudato peritoneal com as preparações fitoterápicas (AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9) e homeopáticas (6CH, 12CH e 30CH) obtidas de *Arnica montana*; onde o controle é constituído por meio RPMI-1640C e LPS 10μg/ml como controle positivo da reação. Das preparações fitoterápicas, apenas AM4 (53,50±5,17), AM5 (49,97±6,05) e AM6 (44,82±3,88) foram capazes de promover liberação de TNF-α, com valores significativos quando comparado ao LPS (172,48 ± 5,59), conforme mostrado na Figura 12.

A Figura 13 mostra que houve baixa liberação de TNF-α pelas preparações homeopáticas 6CH (11,09 ±0,83), 12CH (9,87±0,96) e 30CH (9,22± 0,78), mas quando em adição ao LPS foram capazes de reduzir a produção de TNF-α em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos (Tabela 2).

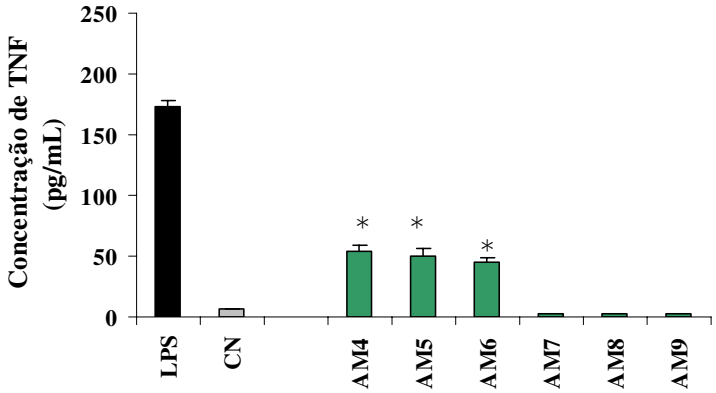

Figura 12- Produção de TNF-α por células do exsudato peritoneal cultivadas com preparações fitoterápicas de *Arnica montana* L. As células peritoneais obtidas de camundongos Swiss foram cultivadas em placas de microtitulação com meio RPMI-1640-C, usado também como controle negativo da reação (CN). Como controle positivo usou-se LPS a 10µg/ml. A concentração de TNF-α foi obtida através de uma reta padrão previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em pg/mL como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos.
*p<0,05 comparado ao LPS

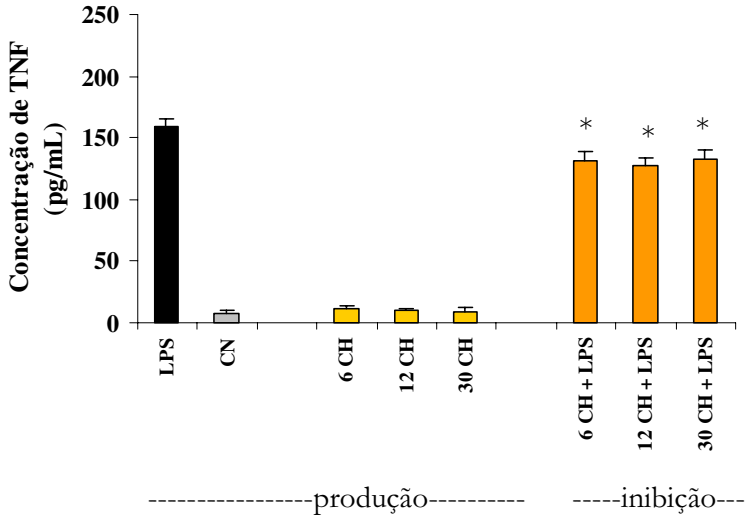

Figura 13- Produção de TNF-α por células do exsudato peritoneal cultivadas com preparações homeopáticas de *Arnica montana* L. As células peritoneais obtidas de camundongos Swiss foram cultivadas em placas de microtitulação com meio RPMI-1640-C, usado também como controle negativo da reação (CN). Como controle positivo usou-se LPS a 10µg/ml. A concentração de TNF-α foi obtida através de uma reta padrão previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em pg/mL como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos.
*p<0,05 comparado ao LPS (159,62 ± 5,59)

Tabela 2. Efeito inibitório das preparações homeopáticas de *Arnica montana* na produção de TNF-α em cultura de macrófagos estimulados por LPS.

Preparações	média ± desvio padrão	% de inibição
RPMI + LPS	159,62 ± 5,59	0
6CH + LPS	131,33 ±7,64[a]	17,70[b]
12CH + LPS	127,48±6,21[a]	20,10 [b]
30CH + LPS	132,76± 7,90[a]	16,80 [b]

[a]p<0,05 comparado à média ± desvio padrão de RPMI+LPS
[b]Resultado comparado aos valores do controle positivo LPS

4.5 Determinação do IFN- γ

A determinação de IFN-γ foi realizada nos sobrenadantes das culturas de células esplênicas de camundongos Swiss com as preparações fitoterápicas (AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9) e homeopáticas (6CH, 12CH e 30CH) obtidas de *Arnica montana*; onde o controle é constituído por meio RPMI-1640C e ConA 0,5µg/ml como controle positivo da reação. Das preparações fitoterápicas, apenas AM4 (4,88±0,86), AM5 (3,74±1,35) e AM6 (1,68±0,61) foram capazes de promover liberação de IFN-γ. As preparações homeopáticas 6CH (1,39 ±0,93), 12CH (1,30±0,62) e 30CH (2,79± 0,58) também promoveram pequena liberação de IFN-γ, com valores significativos quando comparado a ConA 0,5µg/ml (10,53 ± 1,41), dados mostrados na Figura 14.

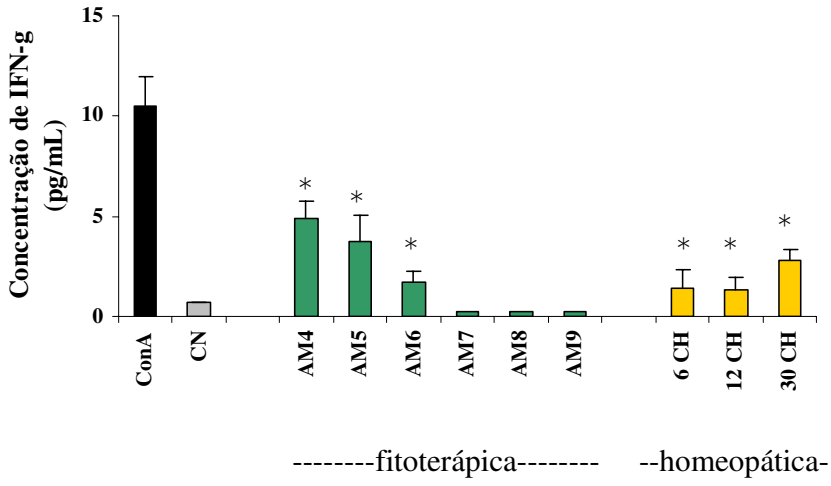

Figura 14- Produção de interferon gama (IFN-γ) por células esplênicas cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana* L. As células esplênicas foram obtidas de camundongos Swiss e cultivadas em placas de microtitulação com meio RPMI-1640-C, usado também como controle negativo da reação. Como controle positivo usou-se ConA a 0,5µg/ml. A concentração de IFN-γ foi obtida através de uma reta padrão previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em pg/mL como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos. *($p<0,05$ comparado com ConA)

4.6 Determinação da IL-4

A determinação de IL-4 foi realizada nos sobrenadantes das culturas de células esplênicas de camundongos Swiss com as preparações fitoterápicas (AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9) e homeopáticas (6CH, 12CH e 30CH) obtidas de *Arnica montana* L.; onde o controle é constituído por meio RPMI-1640C e ConA 0,5µg/ml como controle positivo da reação. Conforme Figura 15, o contato com as preparações fitoterápicas e homeopáticas não induziu a liberação de IL-4.

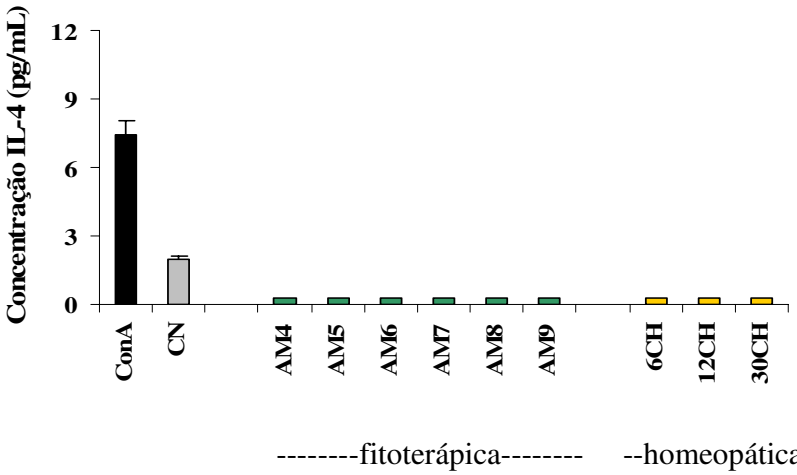

Figura 15- Produção de interleucina-4 por células esplênicas cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana*. As células esplênicas foram obtidas de camundongos Swiss e cultivadas em placas de microtitulação com meio RPMI-1640-C, usado também como controle negativo da reação (CN). Como controle positivo usou-se ConA a 0,5µg/ml. A concentração de IFN-γ foi obtida através de uma reta padrão previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em pg/mL como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos.
*p<0,05 comparado com ConA

4.7 Determinação de IL-6

A determinação de IL-6 foi realizada nos sobrenadantes das culturas de células peritoneais aderentes com as preparações fitoterápicas (AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9) e homeopáticas (6CH, 12CH e 30CH) obtidas de *Arnica montana* L.; onde o controle é constituído por meio RPMI-1640C e LPS 10µg/ml como controle positivo da reação. Das preparações fitoterápicas, apenas AM4 (209,74±86,12), AM5 (162,36±39,86), AM6 (87,94±43,00) e AM7 (69,74±31,26) foram capazes de promover liberação de IL-6. As preparações homeopáticas 6CH (51,16 ±16,79), 12CH (52,44±17,38) e 30CH (48,23± 14,04) também promoveram a liberação de IL-6, quando comparado a LPS 10µg/ml (428,12 ± 81,82), dados mostrados na Figura 16.

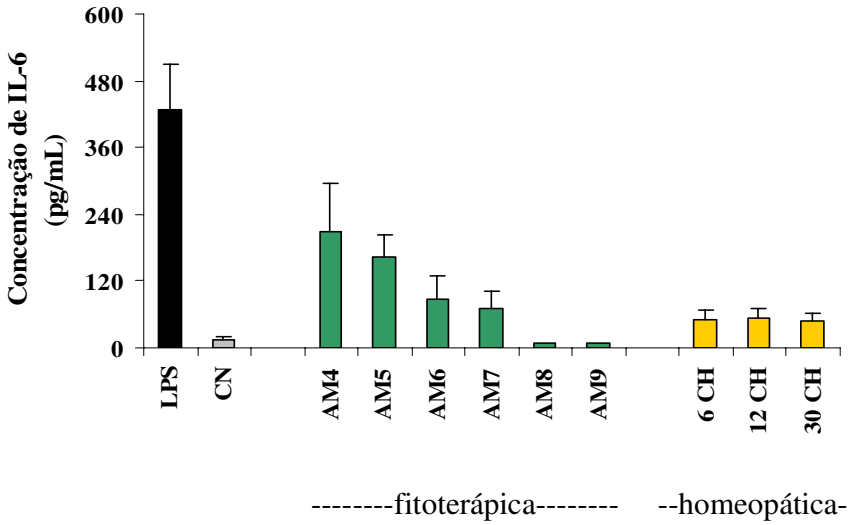

Figura 16- Produção de IL-6 por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana*. As células peritoneais foram obtidas de camundongos Swiss. O meio RPMI-1640-C foi usado como controle negativo da reação (CN) e como controle positivo usou-se LPS a 10µg/ml. Os resultados foram expressos em pg/mL como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos.
*p<0,05 comparado com LPS

4.8 Determinação de IL-1

A determinação de IL-1 foi realizada nos sobrenadantes das culturas de células peritoneais aderentes com as preparações fitoterápicas (AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9) e homeopáticas (6CH, 12CH e 30CH) obtidas de *Arnica montana* L.; onde o controle é constituído por meio RPMI-1640C e LPS 10µg/ml como controle positivo da reação. Nenhuma das preparações testadas é capaz de promover a liberação de IL-1 (Figura 17).

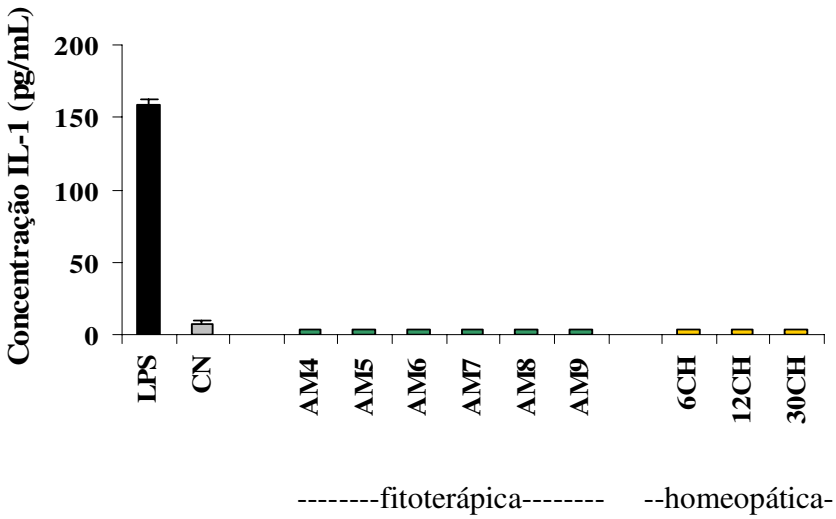

Figura 17- Produção de IL-1 por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana*. As células peritoneais foram obtidas de camundongos Swiss. O meio RPMI-1640-C foi usado como controle negativo da reação (CN) e como controle positivo usou-se LPS a 10µg/ml. Os resultados foram expressos em pg/mL como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos.
*p<0,05 comparado com LPS

4.9 Determinação de IL-12

A determinação de IL-12 foi realizada nos sobrenadantes das culturas de células peritoneais aderentes com as preparações fitoterápicas (AM4, AM5, AM6, AM7, AM8 e AM9) e homeopáticas (6CH, 12CH e 30CH) obtidas de *Arnica montana*; onde o controle é constituído por meio RPMI-1640C e LPS 10µg/ml como controle positivo da reação. Nenhuma das preparações testadas foi capaz de promover a liberação de IL-12 (Figura 18).

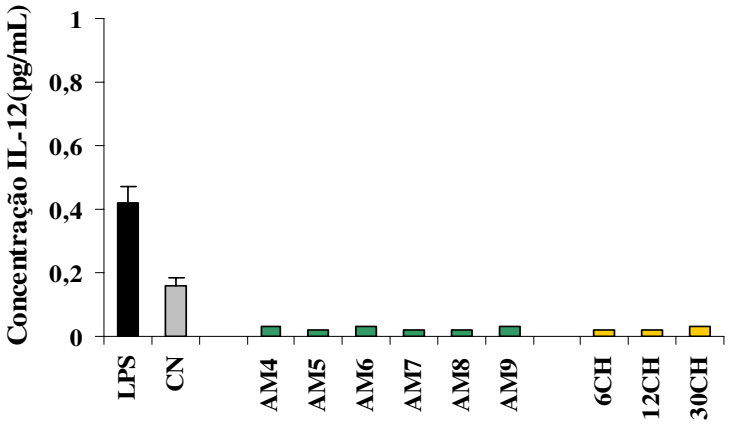

Figura 18- Produção de IL-12 por células do exsudato peritoneal (PEC) cultivadas com preparações fitoterápicas e homeopáticas de *Arnica montana*. As células peritoneais foram obtidas de camundongos Swiss. O meio RPMI-1640-C foi usado como controle negativo da reação (CN) e como controle positivo usou-se LPS a 10µg/ml. Os resultados foram expressos em pg/mL como a média ± desvio padrão de triplicata de cinco experimentos.
*p<0,05 comparado com LPS

V - DISCUSSÃO

A pesquisa laboratorial com medicamentos homeopáticos é muito escassa e enfrenta ainda questionamentos sobre a metodologia aplicada. O uso de modelos com plantas ou animais permite a observação de respostas diretas, as quais eliminam a subjetividade em relação ao efeito placebo, sendo esta a principal crítica aos estudos com humanos (HAMMAN, 2003).

O emprego de plantas medicinais de ação supostamente inofensiva à saúde pode muitas vezes ser responsável por resultados desastrosos, já que, ocasionalmente, uma mesma planta pode apresentar tanto uma ação terapêutica quanto tóxica, conforme dose e modo de preparo (ANKE et al., 2004).

O não cumprimento dos limites de uso dos fitoterápicos representa cada vez mais um risco para a saúde humana. Estudos multidisciplinares, associando fitoquímicos e farmacológicos, tornam-se cada vez mais importantes para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (MACIEL *et al*., 2002).

A ativação de macrófagos e células T por estresse oxidativo e a secreção de citocinas pró-inflamatórias contribuem significativamente para a progressão da ativação do sistema imunitário e inflamação (HULLAN *et al.,* 2003). A resposta inflamatória consiste da liberação seqüencial de mediadores e do recrutamento de leucócitos circulantes (HANADA, 2002).

Durante o processo inflamatório as células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas exercem um papel principal nos mecanismos pró-inflamatórios, garantindo a eliminação da causa infectiva, tóxica ou alérgica, sendo muito importante para a homeostase e integridade do tecido (GOERDT, 1999).

No entanto, é obrigatório que o processo inflamatório, uma vez induzido, não aumente progressivamente, mas sim, seja regulado e diminuído para permitir a cura. A ação descontrolada de enzimas proteolíticas e o processamento de mediadores químicos e radicais livres podem agravar a situação em alguns casos. Há muito tempo que pesquisas sobre a biologia da inflamação têm sido focadas sobre ações pró-inflamatórias de fagócitos mononucleares, incluindo processamento e apresentação de antígeno e secreção de citocinas (GOERDT, 2004).

Os ensaios de citotoxicidade medem a concentração de substâncias capazes de interagir com estruturas e vias bioquímicas celulares que podem ter algum reflexo *in vivo*. Nesse trabalho, determinou-se a viabilidade dos macrófagos peritoneais após contato com as preparações de *Arnica montana* L. A definição da viabilidade celular, nos ensaios realizados, tem como conseqüência assegurar a capacidade de uma resposta imune-celular.

Entre as preparações testadas, utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difenil-tetrazólio (MTT), as que apresentaram maior potencial de toxicidade, ou seja, menor porcentagem de viabilidade celular foram a tintura-mãe AM1 (5%) e as menores diluições estudadas AM2 (8%) e AM3 (29%) (**Figura 6**). Esta metodologia é baseada na redução de um sal de tetrazólio amarelo solúvel por enzimas microssomais e também pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis. Essa redução gera a formazana, um produto insolúvel de cor púrpura que se acumula nas células devido à sua incapacidade de atravessar a membrana celular (MOSMANN, 1983).

Esse dado é justificado na literatura pela presença de compostos como lactonas sesquiterpênicas (helenalina), que possuem conhecida atividade alergizante e tóxica conferida pela dupla ligação no núcleo β-lactona de helenalina (CAPASSO *et al*.,

2000; SIEDLE, 2003; JOHANSSON, 2002), óleos esssencias, taninos e alcalóides pirrolizidínicos (tusilagina, isotusilagina) com conhecida ação citotóxica e carcinogênica (MARTINS *et al*, 2000; AGRAWAL, 1985), são responsáveis por causarem dermatite de contato, hepatotoxicidade, irritação gastrintestinal (SIMÕES *et al*., 1986), dispnéia e falha cardíaca (a helenalina apresenta efeito inotrópico por ação simpaticomimética indireta) (PERIS *et al*., 1995).

Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (AMES, 1983). Estudos farmacológicos mostraram que os diterpenos transformados pelo citocromo P450 em metabólitos hepatotóxicos, podem causar apoptose em hepatócitos de ratos pela captura de tióis e aumento da concentração de cálcio, com ativação das enzimas transglutaminase e endonuclease dependentes de cálcio (FAU et al., 1997).

Como exemplo de planta que contém substâncias com conhecidos efeitos tóxicos pode ser citada o confrei (*Symphytum officinale* L.), utilizada na medicina tradicional como cicatrizante, devido à presença da alantoína, mas também possui alcalóides pirrolizidínicos os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (BUCKEL, 1998).

A arruda (*Ruta graveolens* L.), que pode provocar aborto, fortes hemorragias, irritação da mucosa bucal e inflamações epidérmicas, é outro importante exemplo. Estudos também apontam um possível efeito adverso abortivo da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* L.), planta medicinal de comprovada baixa toxicidade e ação anti-ulcerogênica, antiinflamatória e antinoniceptiva (OLIVEIRA, 1991).

Com relação à determinação de viabilidade celular com as preparações homeopáticas, foi observado um perfil não citotóxico (**Figura 7**), como pressuposto por essas preparações derivarem de diluições infinitesimais, sendo esta a intenção original de Hahnemann: usar o processo de diluição para reduzir os efeitos tóxicos dos medicamentos (JONAS, 1996). Assim, o tratamento homeopático permite ao indivíduo restabelecer a saúde e prevenir a doença sem, no entanto, produzir os efeitos colaterais experimentados por muitos dos tratamentos convencionais (ULLMAN, 1995).

Vários estudos utilizando culturas de macrófagos peritoneais frente a produtos naturais como *Davilla elliptica* St. Hill. (CARLOS *et al*., 2005), *Echinacea purpurea* N. (BURGER *et al*., 1997), *Platycodon grandiflorum* H. (CHUL *et al*., 2001), *Panax ginseng* L. (SONG *et al*., 2002), demonstraram eficácia quanto à capacidade de resposta dessa célula. O macrófago é uma célula que se encontra presente em todos os tecidos do organismo e apresenta funções importantes no sistema imunológico. A ingestão de partículas estranhas e seu processamento levam à ativação do sistema imunológico através da apresentação de antígenos aos linfócitos (outra célula de grande importância na resposta imunológica), da secreção de substâncias (como citocinas e quimiocinas) capazes de regular o sistema imunológico e da elaboração de substâncias capazes de destruir outras células e organismos (ABBAS *et al*., 2000).

Nosso estudo investigou o efeito de *Arnica montana* L. em preparações fitoterápicas e homeopáticas de acordo com o grau de citotoxicidade de todas as preparações testadas. Nesse sentido foram utilizadas as diluições AM4, AM5, AM6, AM7, AM8, AM9 e as homeopáticas 6CH, 12CH e 30CH para verificar os efeitos sobre as células

mediadoras da resposta imunológica, macrófagos e linfócitos, através da determinação da liberação de H_2O_2, NO, TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-1e IL-12.

O sistema imunológico é um considerável mecanismo de defesa no organismo. Seu papel não é apenas o de proteger contra infecções microbianas, mas também atua na prevenção do câncer, inibindo o crescimento de células tumorais (HUANG, 1999).

Os macrófagos ativados são capazes de secretar mais de cem produtos biologicamente ativos, dentre eles enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação, espécies reativas de nitrogênio como o NO, citocinas, etc (PARSLOW et al., 2000).

Entre os produtos secretados pelos macrófagos, estão os reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (ZWILLING E EISENSTEIN, 1994). Espécies reativas do oxigênio podem ter papéis diferentes na célula, dependendo de suas concentrações relativas e também do acesso aos sítios celulares (RAMASARMA, 1990). Um severo "stress" oxidativo está associado com disfunções celulares, resultando na ativação de mecanismos de reparo, apoptose e até necrose das células (FORMAN e TORRES, 2001).

A determinação de H_2O_2 liberado nos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal baseou-se na oxidação do vermelho de fenol mediado pela peroxidase de raiz forte. As principais vantagens desse método são as pequenas quantidades de reagentes e células utilizados, a sensibilidade e reprodutibilidade, o grande número de materiais possíveis de serem testados e especialmente a velocidade e conveniência oferecida pelo leitor de ELISA automático.

A enzima NADPH oxidase presente na membrana plasmática e responsável pela conversão do oxigênio (O_2) ao ânion superóxido ($O_{2.}^-$) e depois a H_2O_2 pela SOD (HAMPTON *et al*., 1998), pode ser rapidamente ativada por estímulos como os agonistas que interagem com receptores específicos na superfície celular de macrófagos, como partículas opsonizadas, cadeias de peptídeos de microrganismos (zymosan) e também pode ser ativada pelos agonistas de proteína quinase C como o PMA ("phorbol myristate acetate").

Os ensaios imunológicos realizados neste trabalho mostraram a não produção de H_2O_2 quando comparada ao controle positivo da reação (zymosan) para as preparações fitoterápicas e homeopáticas (**Figura 8**). Este estudo também mostrou que nenhuma das preparações teve ação na produção ou inibição do peróxido de hidrogênio induzida pelo PMA (**Figura 9**).

O H_2O_2 é gerado em condições fisiológicas, em pequenas quantidades e é rapidamente utilizado ou degradado, mas longas exposições a altas concentrações deste mediador podem destruir estruturas biológicas e levar a um dano celular irreversível. O H_2O_2 é tóxico para as células e é também responsável pela morte das bactérias fagocitadas (RAMASARMA, 1990).

Estudos mostram que o H_2O_2 suprime a resposta imunológica, levando à atividade imunossupressora de linfócitos esplênicos de ratos quando induzidos por LPS (LEE & YEA, 2000). Por outro lado, Nascimento et al. (1998) verificaram que a atividade antitumoral de macrófagos não depende da liberação de H_2O_2. Estudos sobre a ativação de macrófagos peritoneais pela determinação da liberação de H_2O_2 frente a diversos produtos naturais obtidos de plantas como *Paepalanthus sp* (MOREIRA el al., 2000), S*tyrax*

camporum Pohl (MARQUES, 2003), *Alchornea ssp* (BARROS, 2004), *Davilla elíptica* St. Hill (CARLOS, 2005) são cada vez mais freqüentes e categorizados como potentes agentes moduladores da resposta imunológica.

A ativação de macrófagos é acompanhada pelo aumento de diversas propriedades, como aumento da capacidade de aderência, fagocitose e produção de compostos reativos e citocinas (SELIGMANN, 2003), o que lhes confere poder microbicida e tumoricida (BASU, 2006). Macrófagos podem executar esta função de uma maneira direta, envolvendo a liberação de produtos como radicais de oxigênio e nitrogênio e TNF-α que são prejudiciais aos microrganismos e para células tumorais. Ou ainda, eles podem ter uma ação indireta nestas atividades pela secreção de citocinas, as quais sinalizam outras células como os linfócitos T, ou por processamento e apresentação de antígenos, regulando o sistema imunológico e envolvendo-se no processo infeccioso, na modulação da resposta imune e na inflamação (HONG *et al*., 2005).

O NO é uma molécula mensageira envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo a contração da musculatura lisa, a reatividade plaquetária, a neurotransmissão central e periférica e as ações citotóxicas de células imunológicas. Essa molécula é crucial para muitas funções fisiológicas e a sua liberação inapropriada está ligada a numerosas patologias (HOBBS et al., 1999).

Embora a produção e ação do NO sejam evidentes durante o processo inflamatório, a rede de seus efeitos é ainda parcialmente conhecida. Sabe-se que o tempo da sua síntese em resposta a diversos estímulos, bem como os níveis de sua produção, seu estado de oxidação e a presença ou não de certos mediadores definem um efeito citotóxico pró-inflamatório ou antiinflamatório (ROTTERBERG & ÖRN, 1997).

A determinação de NO foi realizada nesse trabalho, segundo a capacidade que o NO tem de sofrer rápida degradação oxidativa em solução aquosa, formando nitrito (NO_2^-), que é determinado pelo reagente de Griess. A reação acontece primeiramente com a sulfanilamida (reação de diazotização) em meio ácido, formando um composto que reage com o naphtiletilenodiamino, formando em seguida um derivado azo colorido prontamente monitorado em espectroscopia de UV/Visível com absorbância máxima em 548nm a pH 2.0. O meio ácido favorece a reação de diazotização, melhorando o rendimento na leitura espectrofotométrica (MALINSKI, 1996).

Os resultados obtidos nesse trabalho (**Figura 10**) mostram que as preparações fitoterápicas AM4, AM5 e AM6 foram capazes de promover a liberação de NO em cultura de macrófagos peritoneais, resultado este não obtido pelas preparações homeopáticas. Portanto foi verificada a presença de inibição das mesmas em presença de LPS (**Figura 11**). As preparações fitoterápicas e homeopáticas notoriamente atuam de maneira diferente, enquanto que a primeira estimula, a segunda inibe.

Portanto, na estimulação de macrófagos por essas diferentes preparações de arnica nota-se que as preparações homeopáticas agem exatamente ao contrário das preparações fitoterápicas (mas de acordo com o seu princípio de similitude), reduzindo, mesmo que discretamente, níveis altos de NO produzido pela estimulação do LPS. Segundo este princípio, uma droga atua de forma terapêutica quando produz em uma pessoa saudável, sintomas semelhantes aos de uma pessoa doente. Assim, uma pessoa intoxicada com arsênico, por exemplo, pode ser tratada com arsenicum, preparação homeopática derivada de diluições deste mesmo mineral (BOERICKE, 1997).

O objetivo da homeopatia é estimular os mecanismos de cura do próprio corpo. A meta da terapia homeopática é promover e orientar a reação de autocura inata do corpo. Os remédios não são dados para eliminar a causa de uma doença ou para vencer um determinado agente patológico. Não é o medicamento em si que cura a doença, mas a reação dos mecanismos de cura do corpo ao medicamento que leva à melhora.

Portanto, agentes que modulem a atividade do NO podem ser de considerável valor terapêutico. Em particular aqueles capazes de reduzir a formação de NO, podem ser benéficos em estados patofisiológicos onde a produção excessiva de NO é um fator contribuinte, como é o caso das doenças inflamatórias (HOBBS et al., 1999).

O conhecimento existente do papel do NO nos estados fisiológicos e patofisiológicos abriu uma gama de possibilidades, especialmente no entendimento dos mecanismos de ação de medicamentos que modulam a ação desse mediador. A ativação da iNOS leva à produção de níveis micromolares de NO, quantidade muito maior do que o nível nanomolar gerado pela enzima constitutiva eNOS ou nNOS (ACHIKE e KWAN, 2003).

Grande atenção tem sido dada à molécula de óxido nítrico atualmente, sendo que vários experimentos utilizando extratos, frações ou substâncias puras obtidas de plantas mostraram interferir com a produção de óxido nítrico. O extrato padronizado de *Gingko biloba* L. (EGb 761) inibiu a produção de NO e a expressão da iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN-γ (KOBUCHI et al., 1997). Alicina e ajoeno, dois composto obtidos do alho (*Allium sativum* L.) inibiram a produção de NO e a expressão da iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (DIRSCH et al., 1998; PAN, 2000).

Resultados de diversos experimentos indicam a possibilidade de que a produção de NO em excesso diminui a expressão da proteína iNOS para prevenir autotoxicidade celular. Um possível mecanismo para esse "feedback" inibitório da síntese da proteína iNOS pelo NO pode ser atribuído a fosforilação mediada por NO de uma molécula regulatória chave na maquinaria transducional, o NF-κB (HAN et al,2001).

Os flavonóides como o picnogenol extraído da *Pinus maritma* apresentam efeitos biológicos na modulação da síntese de iNOS ou mesmo de espécies reativas de nitrogênio (PAKER *et al*, 1999). De forma semelhante os flavonóides presentes em *Silybum marianum* L. são capazes de ativar uma resposta inflamatória, mas promovem supressão da função dos linfócitos T quando baixas doses são administradas em camundongos (JOHNSON et al., 2003).

Diterpenóides de *Sideritis javalambrensis* foram isolados por Heras & Hoult (1994), que atribuíram a esses compostos a propriedade antiinflamatória e gastroprotetora desta planta utilizada tradicionalmente na Espanha. Em trabalho semelhante, o extrato aquoso de *Spiraea prunifolia,* largamente usado na medicina chinesa, também apresentou a capacidade de promover um efeito inibitório sobre a síntese de NO (HONG-SEOB *el al*., 1999).

Outros estudos mostram que extratos obtidos de *Polygonum tinctorium* Aiton são capazes de inibir a síntese de NO em macrófagos peritoneais murinos (ISHIHARA *et al.,* 2000). Resultados semelhantes foram obtidos por Kim et al. (2001), onde compostos extraídos de *Scutellaria baicalensis* N. apresentaram efeitos antiinflamatórios também por inibir a produção de NO e prostaglandina E2 em macrófagos. A inibição da produção de NO foi acompanhada pela supressão da iNOS.

O produto natural epigallocatequina gallate, obtido do chá verde com atividade antiinflamatória, antioxidativa e anticarcinogênica tem se mostrado um eficiente inibidor da expressão do gene de iNOS (CHAN *et al*. 1997). Da mesma maneira alguns efeitos antiinflamatórios dos extratos do fruto de *Evodia rutaecarpa* Hook foram examinados por Chiou *et al*. (1997) através da produção de NO em macrófagos murinos, cujos resultados indicaram uma inibição na produção de NO mesmo em presença de IFN-γ e LPS, que são considerados potentes ativadores dessa molécula, indicando assim uma interferência na síntese da iNOS.

Atualmente, existe uma forte tendência em se estudar compostos naturais que possam participar na modulação do sistema imunológico, demonstrado pela liberação de mediadores por macrófagos. Diferentes classes de substâncias têm sido relatadas como sendo agentes imunoestimulantes.

Outro dado aqui obtido, mostra a liberação de TNF-α por macrófagos peritoneais induzidos pelas preparações fitoterápicas de *Arnica montana* L. AM4, AM5 e AM6; as mesmas responsáveis pela liberação de NO (**Figura 12**). Assim, observa-se uma relação entre as sínteses de NO e TNF-α. Pois o aumento da produção de NO se deve, entre outros fatores, à indução de mediadores pró-inflamatórios como TNF-α. Por outro lado, as preparações homeopáticas, apesar de não promoverem a liberação de NO, conseguiram influenciar na produção de TNF-α, liberando baixas concentrações deste mediador e, quando em associação ao LPS, diminuíram sua produção estabelecida por esse agente estimulante, portanto inibindo-o (**Figura 13**). Deste modo, as preparações homeopáticas podem atuar no equilíbrio da produção de TNF-α. E como já detalhado anteriormente, as

preparações homeopáticas apresentam características que divergem do mecanismo de ação farmacológica de um fitoterápico.

No início da cascata de ativação, duas quinases conhecidas como IκKα e IκKβ são ativadas para formar um dímero (IκK) que fosforila uma proteína inibidora conhecida como IκB. Essa proteína está ligada em um complexo no citosol, com o fator de transcrição NFκB e inibe sua ação, retendo-o naquele local. Quando o dímero IκB é fosforilado, ele dissocia-se do complexo e é rapidamente degradado por proteossomas. Após a remoção de IκB, o NFκB entra no núcleo e liga-se a vários promotores, ativando genes que contribuem para a imunidade adaptativa e para a secreção de citocinas pró-inflamatórias. O próprio gene para o IκB também é ativado, sendo rapidamente sintetizado, inativando o sinal NFκB (JANEWAY *et al*., 2000). Isso explica porque muitos genes que respondem a ativações por LPS, incluindo TNF-α, compartilham seqüências gênicas reconhecidas por NFκB para a ativação da expressão de algum outro gene como o da iNOS.

Um grande número de compostos naturais parece interferir com a cascata que leva à ativação do NF-κB. O efeito de muitos extratos brutos obtidos de fontes naturais pode ser agora explicado baseando-se no fato dessas plantas conterem agentes reguladores do NF-κB, como os diterpenóides e as lactonas sesquiterpênicas. A sinalização envolvida na inibição da síntese de citocinas é complexa e existem muitas abordagens que podem efetivamente regular a expressão de TNF-α (PALLADINO *et al*., 2003).

O efeito antiinflamatório do extrato aquoso de *Lonicera japonica* Thumb. foi investigado por Lee *et al.* (2001). Os autores verificaram inibição das sínteses de iNOS, TNF-α e NF-kappaBp65 e da degradação de l-kappaBalfa; sugerindo que esta planta possa

atuar como agente terapêutico em doenças inflamatórias através de uma regulação seletiva da ativação de NF-kappaB.

A redução na produção de TNF-α e de NO em cultura de macrófagos tratados com curcumina, uma substância extraída da planta *Curcuma longa* L., foi observada por Chan *et al*. 1998 que atribuíram esse fato à inibição do fator de transcrição nuclear NF-kβ, através da prevenção da degradação do IκB que possui papel chave na expressão de muitos genes relacionados com a inflamação. Rao & Ghosh (1999) também atribuíram a não produção desses mediadores à inibição do mecanismo de transcrição comum aos seus genes, para isso utilizaram cultura de macrófagos murinos tratados com quercetina, o principal componente ativo da planta *Rhododendron cinnabarium* N.

O TNF-α atua em sinergismo com o IFN-γ na ativação macrofágica, especialmente na indução de NO (JANEWAY *et al*, 2000). A produção de NO por macrófagos peritoneais de ratos tratados com rIFN-γ ocorreu concomitantemente com a liberação de TNF-α favorecida por *Sinomenium acutum* Rehder (KIM *et al.,* 1999) e por *Taraxacum officinale* Weber (KIM & CHUNG 1999). Do mesmo modo, resultados condizentes foram observados em estudo do extrato de *Ulmi radicis*, onde os dados sugerem que a capacidade do extrato em aumentar a produção de NO em macrófagos peritoneais de ratos primeiramente tratados com IFN-γ é devido à liberação de TNF-α induzida pelo próprio extrato (KIM & LEE, 1999).

Interação de proteínas de membrana com proteínas solúveis como as citocinas, anticorpos, complemento e receptores sobre as células, representam os elementos de comunicação da conversa cruzada das células do sistema imunitário (TRINCHERI, 1997).

O IFN-γ foi originalmente definido como um agente com ação antiviral, mas suas propriedades incluem a regulação de vários aspectos da resposta imune, como a estimulação da atividade microbicida dos macrófagos, estimulação da apresentação de antígenos pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal, coordenação e as interações entre os leucócitos e o endotélio, efeitos na proliferação celular e na apoptose, bem como na estimulação e repressão de vários genes cuja significância funcional ainda permanece obscura (BOEHM *et al.*, 1997).

As citocinas presentes durante a expansão de células T influenciam na capacidade das células Th em diferenciar-se em células Th1 ou Th2 (TRINCHERI, 1997). Esta dicotomia na resposta imune pode ser classificada didaticamente em resposta celular ou humoral. A produção de citocinas como IFN-γ e IL-12 leva à resposta celular tipo Th1, enquanto a IL-4, por exemplo, leva a resposta humoral do tipo Th2 (DREDGE *et al*., 2002). Os macrófagos podem influenciar características Th1/Th2 da imunidade e responder a ativação das células T e B através de interação celular e produtos solúveis como IFN-γ, IL-4 e anticorpos que regulam atividades fagocíticas e microbicidas (GORDON, 1998).

O IFN-γ e IL-4 têm papéis importantes na efetivação das respostas Th1 e Th2 respectivamente, e essas citocinas possuem ainda a função de serem antagonistas uma da outra (PALUDAN *et al*., 1999). O desequilíbrio da resposta imune Th1/Th2 muitas vezes é responsável pelo agravamento de uma doença (GOERDT, 1999).

Os resultados aqui apresentados revelam que as preparações fitoterápicas AM4, AM5 e AM6 e homeopáticas 6CH, 12CH e 30CH são capazes de promover a liberação de IFN-γ em cultura de células esplênicas (**Figura 14**). Resultado semelhante não

foi obtido nos ensaios de liberação da IL-4 (**Figura 15**), onde não foi detectada presença desta interleucina.

As preparações fitoterápicas capazes de induzir a produção de NO por macrófagos, também induzem a liberação de IFN-γ em cultura de células esplênicas. De fato, IFN-γ estimula a indução da transcrição da óxido nítrico sintase (iNOS) e conseqüentemente leva a uma indução na produção de NO (PALUDAN, 1999). Dessa forma, a interação entre macrófagos e linfócitos e a liberação de citocinas e NO são controles críticos nas reações imunes (HOLÁN *et al*., 2001).

Existem vários estudos laboratoriais sobre as diluições da homeopatia. Preparações homeopáticas de interferon e hormônios podem aumentar a taxa de glóbulos brancos e outras funções imunológicas em animais (JONAS, JACOBS, 1996). Existem ainda minerais como silício, zinco e cálcio que, quando em preparações homeopáticas, apresentam efeitos indutores no sistema imunitário (HARISCH; 1988; 1989).

A interleucina 4 (IL-4) é uma citocina pleiotrópica que exerce uma grande variedade de efeitos sobre diferentes tipos de células do sistema imunitário. Ela afeta granulócitos, fibroblastos, células endoteliais e células B, além de ter um importante papel na hematopoiese, inflamação e no desenvolvimento de respostas células T efetoras (GORDON, 1998). Esta citocina é um fator de crescimento para células T, B e NK e induz a secreção tardia das imunoglobulinas IgG1 e IgE. Ela leva a uma resposta imune tipo Th2 (PALUDAN, 1999). No entanto, esta citocina também exerce profundo efeito antiinflamatório sobre monócitos/macrófagos, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores (CHOMARAT, 1998).

A regulação e expressão de genes e moléculas associadas à inflamação acontecem de forma antagônica por IL-4 e IFN-γ, por exemplo, moléculas produzidas por macrófagos alternativamente ativados são induzidas por IL-4 e inibidas por IFN-γ, enquanto moléculas produzidas por macrófagos classicamente ativados são induzidas por IFN-γ e inibidas IL-4 (ORFANOS, 1999).

Outro dado pertinente a este estudo foi a liberação de IL-6 por macrófagos peritoneais em resposta à ativação pelas preparações fitoterápicas AM4, AM5, AM6 e AM7 e também pelas preparações homeopáticas 6CH, 12CH e 30CH (**Figura 16**) que não apresentaram valores significativamente diferentes entre si. Todos os valores obtidos neste ensaio, incluindo o do controle positivo, apresentaram o valor de desvio padrão alto, o que pode ser explicado pelo fato que a cultura das células do exsudato peritoneal não são originárias de camundongos isogênicos, provocando deste modo uma resposta não condizente a média dos valores.

Os níveis fisiológicos de IL-6 são geralmente muito baixos, entretanto se elevam rapidamente em resposta a vários estímulos como infecções bacterianas ou virais, danos tissulares induzidos pela inflamação e outros tipos de traumas (POLI, 1998). Embora a resposta ótima à infecção e lesão pareça ser mediada somente em presença da IL-6, sua importância relativa varia em cada caso, possivelmente como resultado da interação com outros mediadores também liberados (RAMSAY e KOPF, 1998).

A produção de IL-6 é rapidamente induzida durante a resposta infamatória aguda, fase inicial. A IL-6 é um dos exemplos típicos de citocinas multifuncionais, uma vez que atua regulando a resposta imune, hematopoiese, proteínas de fase aguda, entre outras

funções, indicando que a IL-6 desempenha papel central nos mecanismos de defesa (KISHIMOTO, 1989).

Outras interleucinas também podem atuar na resposta pró-inflamatória como a IL-1 e IL-12, mas apesar disso os resultados obtidos nesse trabalho mostram a não produção desses mediadores frente às preparações fitoterápicas e homeopáticas (**Figura 17 e 18**). A IL-1 é produzida por macrófagos ativados e atua juntamente com o TNF-α como um mediador da resposta inflamatória e da imunidade inata. A IL-12 é um heterodímero e seu papel biológico é a ativação da resposta Th_1, através da indução da produção de IFN-γ, proliferação de células T e citotoxicidade mediada por células NK.

A produção de citocinas está entre as mais precoces marcas detectáveis de ativação de macrófagos quando uma resposta imune é ativada (PENNANEN et al, 1995). *Echinacea purpurea* tem sido largamente utilizada como um estimulante do sistema imune e estudos *in vitro* mostraram que essa planta pode aumentar a produção de IL-1, IL-6 e TNF-α pelos macrófagos (BURGER *et al*., 1997). Fato semelhante ocorre com *Platycodon grandiflorum* J. uma planta da medicina tradicional considerada como um potente estimulante da função macrofágica. (CHUl *et al*., 2001).

Albert Robin, em 1905, escreveu: "O medicamento não age pela sua massa e sim pelo seu dinamismo". Embora ainda não se saiba exatamente como a homeopatia funciona, tem-se que o processo de dinamização é a liberação da energia dinâmica nos medicamentos por intermédio de vibração molecular (sucussão) (NOGUEIRA et al., 1986).

Atualmente, sabe-se muito bem que a água e as misturas de água/álcool não são simplesmente dispersões uniformes de moléculas e átomos, mas muitas vezes se organizam em determinados padrões chamados padrões de coerência. Há uma série de

formas possíveis através das quais esses padrões podem ser estabilizados e propagados através de diluições subseqüentes durante o processo de sucussão ou agitação. Entre esses mecanismos possíveis encontram-se: (1) formação de clatratos (na qual as moléculas de água formam "aglomerados" em padrões específicos que imitam as substâncias químicas que dissolvem) (Anagnostatos, 1994 *apud* JONAS, JACOBS, 1996); (2) efeitos de auto-organização isotópica de isótopos de oxigênio (nas quais as moléculas de água "pesada" canalizam informações específicas, pois seus "spins" moleculares são únicos em comparação às moléculas de água regulares) (BEREZIN, 1990, 1994 *apud* JONAS; JACOBS, 1996); (3) campos de polarização eletrodinâmicos (nos quais a energia eletromagnética, com a luz, organiza outras moléculas com as quais entra em contato) (DEL GIUDICE, 1990, 1994 *apud* JONAS, JACOBS, 1996); (4) excitação coerente na qual as moléculas que vibram em uma freqüência "ativam" outras moléculas. (RUBIK, 1990 *apud* JONAS, JACOBS, 1996).

Assim como a descoberta dos antibióticos revolucionou nossa capacidade de tratar muitas doenças infecciosas, a descoberta do que acontece quando um preparado é feito e como influencia o corpo pode revolucionar nosso conhecimento de química, biologia e medicina. Se for apenas uma reação ao placebo, ainda oferecerá informações importantes sobre como nossa mente e nosso corpo operam. De qualquer maneira, a exploração de como a homeopatia funciona beneficiaria a ciência moderna (JONAS, JACOBS; 1996).

O desenvolvimento de terapias capazes de modular o processo de inflamação, sem suprimir o efeito desejável dos seus aspectos fisiológicos, poderia ser uma interessante alternativa para se obter melhor eficácia da resposta tecidual contra agressores

externos. Hoje em dia, medicamentos homeopáticos são constantemente usados no tratamento de processos inflamatórios. As defesas próprias do organismo e inerentes à cura são induzidas por medicamentos homeopáticos, visando mobilizar a reação natural do corpo debilitado (PEDALINO, 2004).

A definição de moléculas envolvidas na ativação de macrófagos durante a modulação através dos medicamentos homeopáticos pode nos fornecer uma definição mais clara de alvos terapêuticos. O entendimento do mecanismo de transcrição do gene das citocinas é de interesse fundamental para estratégias futuras no desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças relatadas com o sistema imunológico.

Os resultados expostos nesse trabalho contribuem para o estudo da resposta inflamatória, mostrando que a continuidade das investigações de substâncias derivadas de plantas abre uma enorme possibilidade em se conhecer os mecanismos de ativação/inibição do sistema imunológico, para a obtenção de um total efeito benéfico dos mediadores pró-inflamatórios no organismo.

VI - CONCLUSÕES

A análise dos resultados permite concluir:

a) As preparações fitoterápicas de arnica não apresentaram capacidade em ativar macrófagos para liberar H_2O_2, IL-1 e IL-12 e linfócito para liberar IL-4.
b) As preparações AM4, AM5 e AM6 estimulam macrófagos a liberarem NO, TNF-α e IL-6 e linfócitos a liberar IFN-γ.
c) As preparações homeopáticas mostraram ser capazes de induzir a liberação das mesmas citocinas que as preparações fitoterápicas, mas em concentrações menores.
d) As preparações homeopáticas apresentaram efeito inibitório discreto sobre a produção de NO e TNF-α em cultura de macrófagos induzidos por LPS.
e) As preparações de arnica apresentaram ação estimulante sobre a ativação de macrófagos.
f) O estudo da atividade imunológica das preparações de *Arnica montana* L. sugere que a capacidade de ativar macrófagos, com conseqüente liberação de NO, TNF-α, IFN-γ e IL-6 pode modular a resposta imunológica através da relação entre esses mediadores.
g) O efeito imunoestimulatório observado pode ser benéfico no aumento da imunidade em doenças infecciosas. Além de contribuir para o avanço da pesquisa fitoterápica e homeopática.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 3ª. ed., Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2000, 486p.

ACHIKE, F. I.; KWAN, C. Y. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signaling pathway. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**., Carlton, v.30, p.605-615, 2003.

AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R.S. ^{13}C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.23, p.389-418, 1985.

AKIRA, S.; HIRANO, R.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL1 and TNF). **Faseb J.,** v.4, n.11, p.2860-2867, 1990.

AMES, B.N.; Immunopharmacological properties of flavonoids. **Science**, v. 221, p. 1256, 1983.

ANKE, S.; NIEMULLER, D.; MOLL, S.; HANSCH, R.; OBER, D. Polyphyletic origin pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. **Plant Physiology**, v. 136, p. 4037-4047, 2004.

BABIOR, B.M.; BECKER, E.T. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **N. Engl. J. Med**., 298: 659-68, 1978.

BAGCHI, D.; KUSZYNSKI, C.; BALMOORI, J.;BAGCHI, M.; STOHS, S.J. Hydrogen peroxide-induced modulation of intracellular oxidized states in cultured macrophage J7774A.1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. **Phytotherapy Res**., v.12, p.568-571, 1998.

BARROS, F. C. M. Avaliação da atividade imunológica In vitro de Alchornea ssp quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral-alfa por macrófagos murinos. 2004. 151 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

BASU, S.; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytoth. Res.** 20(10): 896-900. 2006.

BEEKMAN, A. Structure-Cytotoxicity relationships of some Helenanolide-Type Sesquiterpene Lactones. **J. Nat. Prod**., v. 60, n. 3, p.252-257, 1997.

BERKA, V.; CHEN, P.F.; TSAI, A.L. Spatial relationship between L-arginine and heme binding sites of endothelial nitric-oxide synthase. **Biol. Chem**., v.271(52), p.33293-33300, 1996.

BIANCHI, R. Ensaio de toxicidade excessiva e screening fitoquímico de algumas espécies do gênero Baccharis L. (Asteraceae). **Rev. Brás. Farm**., v. 74, p. 79-80, 1993.

BINGISSER, R.M.; TILBROOK, P.A.; HOLT, P.G.; KEES, U.R. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disrutio of the jak3/STAT5 signaling pathway. J. Immunol., 160: 5729-5734, 1998.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon-γ. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.749-795, 1997.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by Interleukin-10. **J. Exp. Med.**, v.174, n.6, p.1549-1555, 1991.

BORENFREUND, E.; BALBICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro citotoxicity assays – The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxic. In Vitro**, v.2, n.1, p.1-6, 1998.

BUCKEL, P. Naturwissenschaften, v. 85, p. 155, 1998.

BURGER, R.A.; TORRES, A.R.; WARREN, R.P.; CALDWELL, V.D.; HUGHES, B.G. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. **Immunopharmacol**. v.19(07), p.371-379, 1997.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N.; **Fitoterapia**, São Paulo, v.58, 71p, 2000.

CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.C.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S. & SILVA, C.L. Disturbances in the production of interleukin-1 necrosis and tumor factor in disseminated murine sporotrichosis. **Mycopathol.**, 127: 189-94, 1994.

CARLOS, I.Z.; Lopes, F.C.M.; Benzatti, F.P.; Carli, C.B.A.; Marques, M.F.; Calvo, C.M.; Vilegas, W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. **Braz. Pharmacog.**, v. 15, p 44-50, 2005.

CASA, C.; VILLEGAS, I.; MOTILVA, V.; CALERO, M.J.M. Evidence for protective and antioxidant of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Ethnopharmacol. J**.v71, p.45-53, 2000.

CERQUEIRA, M.B.S.; SOUZA, J.T., JÚNIOR, R.A.; PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas de *Lychnophora ericoides* Mart. **Ciência e Cultura**, v.39, n.5/6, p.551-553, 1987.

CHAN, M. M. Y.; FONG, D.; HO, C. T.; HUANG, H. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme actyvity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. **Biochemical Phamarcol**. 54: 1281-1286, 1997.

CHAN, M. M. Y.; HUANG, H.; FENTON, M. R.; FONG, D. In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. **Biochem. Phamarcol**. 55: 1955-1962, 1998.

CHIOU, W.; SUNG, Y.; LIAO, J.; SHUM, A. Y. & CHEN, C. Inibitory effect of dehydroevodiamine and evodiamine on nitric oxide production in cultured murine macrofaphages. **J. Nat. Prod**. 60: 708-711, 1997.

CHOMARAT, P., BANCHEREAU, J. Intreleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies**. Int. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 1-52, 1998

CHUL YC, JI YK, YOUNG SK, YOUNG CC, KYUNG-SOO H, HYE GJ. Augmentation of macrophage functions by an aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum*. **Cancer Lett.** v. 166, p. 17-25, 2001.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958.p.74.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1968. v.1., p.738-39.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**: Artes e ciência um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. 230p.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1. **Dig. Dis. Sci.,** v. 33, n.3, p. 25-35, 1988.

DIRSCH, V. M.; KIEMER, A. K.; WAGNER, H.; VOLLMAR, A. M. Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. **Atherosclerosis,** Limerick, v.139, p.333-339, 1998.

DRAPIER, J.C.; WIETZERBIN, J. & HIBBS, J.B. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. Eur. J. Immunol., v.18: 1587-92, 1988.

DRATH, D.B.; KARNOUSKY, M.L. Superoxide production by phagocytic leukocytes. J.Exp.Med., 141: 257-61, 1975.

DREDGE, K.; MARRIOTT, J.B.; TODRYK, S.M.; DALGLEISH, A.G. Adjuvants and the promotion of TH1-type cytokines in tumor immunotherapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.51, p.521-531, 2002.

FAU, D. ; LEKEHAL, M. ; FARRELL, G. ; MOREAU, A. ; FELDMANN, G. ; HAOUZI, D. ; PESSAYRE, D. ; **Gastroenterol**. 1997, v.113, p1334-1342.

FERRI, M. G. **Plantas do Brasil**: espécies do cerrado. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1969. p. 194-197.

FORMAN, J. H.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Mol. Aspects Med.**, v.22, n.4-5 p.189-216, 2001.

FRIEDL, R.; THOMAS, M.; KOPP, B.; GERHARD, P.S. Stimulation of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of Panax ginseng root in Raw 264.7 cells. Pharmacol., v. 34, p. 1663-1670, 2004.

FUSHIYA, S.; KABE, Y.; IKEGAYA, Y.; TAKANO, F. (+)- Rhododendrol and epi-rhododendrin suppress the NO production by activated macrophages in vivo. **Plant. Med.** v.64, p.598-602, 1998.

FUSS, I.J.; STROBER, W. Animal models of inflammatory bowel disease: insights into the pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Curr. Gastroenterol**. v. 14:476-82, 1998.

GATELY, M.K.; RENZETTI, L.M.; MAGRAM, J.; STERN, A.S.; ADORINI, L.; GUBLER, U.; PRESKY, D.H. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**., v.16, p.495-521, 1998.

GAZZINELLI, R.T.; HIENY, S.; WYNN, T.A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, n.13, p.6115-6119, 1993.

GOERDT, S.; ORFANOS, C.E. Other Functions, Other Genes: Alternative Activation of Antigen-Presenting Cells. **Immunity,** v.10, p.137-142, 1999.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Res. Immunology,** v. 149, p.685-688, 1998.

GREEN, L. C. WAGNER, D. A., GLOGOWSKI. J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., TANNERNBAUN, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem**. V.126, p.131-138, 1982.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidade, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HAMMAN, B.; KONING, G.; LOK, K.H. Homeopathically prepared gibberellic acid and barley seed germination, **Homeopathy**, v.92, p. 140-144, 2003.

HAN, Y.; KWON, Y.; CHUNG, H.; LEE, S.; SIMMONS, R.L.; BILLIAR, T. R.; KIM, Y. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kB activation: role of H_2O_2 and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophage. **Biol. Chem.** v.5, p. 504-513, 2001.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflamation. **Cytokin. Rev.** v. 13, p. 413-421, 2002.

HERAS, B.; HOULT, J.R.S. Non-cytotoxic inhibitions of macrophage eicosanoid biosynthesis and effects on leukocyte functions and reative oxygen species of two movie anti-inflammatory plant diterpenoids. **Plant. Med**., v.60, p.501-506, 1994.

HIBBS, J.B.Jr; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RAUCHLIN, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commum.,** v.157: 87-94, 1988.

HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage citotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**. v.235, p.473-476, 1987.

HOBBS, A. J.; HIGGS A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v.39, p.191-220, 1999.

HOEHNE, F. C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo: Graphicards, 1939. p. 225-226.

HOLÁN, V.; KRULOVÁ, M.; ZAJÍCOVÁ, A.; PINDJÁKOVÁ, J. Nitric oxide as a regulator and effector molecule in the immune system. **Mol. Immunol.** v.38, p.989-995, 2001.

HOLLOWAY, A. F.; SHANNON, M.F. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. **Mol. Immunol**. v. 38, p.567-580, 2001.

HONG-SEOB, S.; PARK, R.; OH, H.M.; CHAI, K.Y.; LEE, J.H.; CHUNG, H.T. Enhancement of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *Spiraea prunifolia* var. simpliciflora's root in raw 264.7 cells. **Immunopharmacol. Immunotoxicol**. v.21(2), p.343-355, 1999.

HONG, S.; JEONG, H.; CHUNG, H.; KIM, H; CHAE, H.; SHIN, T.; SEO, Y., KIM, H. An herbal formula, Herbkines, enhances cytokines production from immune cells. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 149-155, 2005.

HUANG, M.D.; ALKHARRAT, A.; MALVY, D. Nitric oxide involvement in the anti-tumor effect of mistletoe (Viscum album L.) extracts Iscador on human macrophages. Arzneimittel. Res. 56(6A):457-60.1999.

HULLAN, S.M.; LIM, S.N.; SADISH, H.K. Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccaharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. Bioch. Bioph. Res Comm. 7; 345(3): 1215-23. 2003.

ISHIHARA, T.; OKURA, T.; KOHNO, K.; TANIMOTO, T.; IKEGAMI, H.; KURIMOTO, M. Polygonum tinctorium extract suppresses nitric oxide production by activated macrophages through inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. J. Ethnopharmacol. v.72(1-2), p.141-150, 2000.

IYENGAR, R.; STUEHR, D.J. & MARLETTA, M.A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 84: 6369-73, 1987.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D. **Imunobiologia**: O sistema imunológico na saúde e na doença. Artmed. Porto Alegre, 2000. 634p.

JOHANSSON, V.S. Granny's remedy explained at the molecular level: helenalin inhibits NF-kappaB. **,** 2002

JOHNSON, V.J.; HE, Q.; OSUCHOWSKI, M.F.; SHARMA, R.P. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates in ammatory processes at high doses. **Plant. Med.**, v. 69: 44-49, 2003.

JOLY, A.B. **Botânica**. Introdução à Taxonomia Vegetal, 7ª Ed., Editora Nacional, São Paulo, 1985, p.219.

JONAS, W.B.; JACOBS, J. **A cura através da hometopatia**, Rio de Janeiro, Editora Campus, 1996.

KADOTA, S.; PRASAIN, J. K.; LI, J. X.; BASNET, P.; DONG, H.; TANI, T.; NAMBA,T. Blepharocalyxins A and B, novel diarylheptanoids from *Alpinia bleapharocalyx*, and their inhibitory effect on NO formation in murine macrophages. **Tetr. Lett.** 37: 7283-7286, 1996.

KIM, H.M.; OH, C.H.; CHUNG, C.K. Activation of inducible nitric oxide synthase by *taraxacum officinale* in mouse periotoneal macrophages. **Gen.Pharmacol**. v.32: 683-688, 1999.

KIM, J. Y.; OH, K.N.; HAN, E. H.; KIM, D. H.; JEONG, T. C.; LEE, E. S.; JEONG, H. G. Methoxychlor-induced nitric oxide synthase and proinflamatory cytokines expression in macrophages via NF-kB, ERK, and p38 mitogen-activated proteinkinases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 333, p. 1234-1240, 2005.

KIM, H.; KIM, Y.S.; KIM, S.Y.; SUK, K. The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production. **Neurosci Lett**. v. 309(1), p.67-71, 2001.

KIM, H.M.; OH, C.H.; CHUNG, C.K. Production of nitric oxide in mouse peritoneal macrophages after priming with interferon-γ by the stem of *Sinomenium acutum.* **J. Ethnopharmacol**. v.66, p.311-317, 1999.

KIM, H.M.; LEE, S.O.; LEE, E.H. The nitric oxide producing properties of *Ulmi radicis* cortex extract. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** v.21(2), p.295-306, 1999.

KOBUCHI, H.; DROY-LEFAIX, M. T.; CHRISTEN, Y.; PACKER, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. **Biochem. Pharmacol**., New York, v.53, p.897-903, 1997.

KISHIMOTO, T. The biology of interleukin-6. **Blood,** v.74, n.1, p.1-10, 1989.

LASRWAL, F.P.; SMITH C.; REES R. Homeopathic Arnica 30x is ineffective for muscle soreness after long-distance running: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clin. Pain**., v. 14, p. 227-31, 1998.

LEE, J.H.; KO, W.S.; KIM, Y.H.; KANG, H.S.; KIM, H.D.; CHOI, B.T. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicea japonica* flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degration in rat liver. **Int. J. Mol. Med.** v.7, p.79-83, 2001

LEE, M.; YEA, S.S. Hydrogen peroxide inhibits the immune response to lipopolysccharide by attenuating sinaling through c-Jun N-terminal kinase and p38 associated with protein kinase C. **Immunopharmacol**. v.48, p.165-172, 2000.

LYSS G, SCHMIDT TJ, MERFORT I, PAHL HL. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF-kappaB. **Biol Chem**., 378(9):951-61, 1997

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Platarum de Estudos da Flora, 1998. p.332.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; MARTINS, J. R.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.; LAPA, A. J.; VANDERLINDE, F. A.; *Phytochem. Pharmacol. II Ser. Recent Prog. Med. Plants* **2002**, *8*, 460. **Plantas medicinais: cura segura?** Quím. Nova vol.28 no.3 São Paulo May/June 2005

MALINSKI, T.; KUBASZEWSKI, E.; KIECHLE, F. Nitric oxide synthase characterization and functional analysis. **Mahin D. Maines**. New York, p.14-33,1996.

MALONE, M.H. The pharmacological evaluation of natural products – General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. J. Ethnopharmacol., v.08, p.127-47, 1983.

MARODI, L.; TOURNAY, C.; KAPOSZTA, R.; JOHNSTON, R.B.; MOGUILEVSKI, N. Augmentation of human macrophage candidacidal capacity by recombinant human myeloperoxidase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Infect. Immun.** 1998; 66: 2750-2754.

MARQUES, M.F.; ARAUJO, A.R.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Determinação dos compostos reativos do hidrogênio e do nitrogênio frente aos constituintes químicos de *Styrax ferrugineus* Mart. Anais da Jornada farmacêutica da UNESP. P.65, 1999.

MARQUES, M.F. A molécula de óxido nítrico e sua inter-relação com o fator de necrose tumoral-α na resposta imunológica induzida por *Styrax camporum* Phol. 2003. 102 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais. UFG. Viçosa-MG, 2000. 220p.

MARTINS, A. R; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Efeito dos extratos brutos de Cephaelis ipecacuanha e Mikania glomerata na pleurisia em ratos. XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, 17-20 set, 1996. Anais F-003. XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, 17-20 set., 1996.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev**, v.43, p.109-142, 1991.

MOREIRA, R.G.D.; CARLOS, I.Z.; VILEGAS, W. Macrophage activation by *Paepalanthus spp* extracts. **Rev. Bras. Farmacog**. V.9/10, p.37-42, 2000.

MOREIRA, R.G.D.; CARLOS, I.Z.; VILEGAS, W. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. **Biol. Pharm**. **Bull.** v. 24(2), p.201-204, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Aplication to proliferation and citotoxicity assays. **J. Immunol**., (65) 55-63, 1983.

NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res.**, v.4, suppl. 3, p. 233-242, 2002.

NASCIMENTO, F.R.F.; DIAS, F.R.; RUSSO, M. Cytotoxic activity of BCG-activated macrophages against L929 tumor cells is nitric oxide-dependent. **Braz. J. Med. Biol. Res.** V.31, p.1593-1596, 1998.

NATHAN, C.F.; HIBBS, J.B.Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.,** v. 3: 65-70, 1991.

NOGUEIRA, G. W. G.; RIMOLI, M.A.; TURCI, M. B.; GUILHERME, S.D.; MOLLO, S.A.; BARNABÉ, V.D. **Doutrina Médica Homeopática**, São Paulo, Grupo de Estudos Homeopáticos de São Paulo "Benoit Mure", 1986.

NORTH, G. L. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant Andrographis paniculata Nees. Immunopharmacol Immunotoxicol. v. 20, p. 139-51. 1978.

NUSSLER, A.K.; BILLIAR, T.R. Inflammation, Immunoregulation and Inducible nitric oxide synthase. **J.Leuk.Biol**. v.54, p.171-178, 1993.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v. 8, n.3, p. 275-283, 1998.

OLIVEIRA JÚNIOR, A.C.; FAQUIM, V.; PINTO, J.E.B.P.; LIMA SOBRINHO, R.R.; BERTOLUCCI, S.K.V. Teor e rendimento de óleo essencial no peso fresco de arnica, em função de calagem e adubação. **Hort. Bras**., Brasília, v.23, n.3, p.735-739, jul-set 2005.

OLIVEIRA, P.M. Efeito da 4-O-Metil Epigalocatequina extraída das folhas de espinheira santa sobre a secreção gástrica de ácido induzida pela histamina. XIII Simpósio de Plantas Medicinais, Fortaleza, CE, 20-23 set, Anais 077. 1994.

PAKER, L.; RIMBACH, G.; VIRGILI, F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pinus maritma) Bark, Pycnogenol. Rad. Biol. Med., v.27, 704-724, 1999.

PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L. L. Anti TNF-α therapies: the next generation. **Nat. Rev. Drug Discov.**, London, v.2, p.736-746, 2003.

PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endotelial cells synthezise nitric oxide from L-arginine. **Nature**. V.333, p.664-666, 1988.

PALMER, R.M.J.; RESS, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.153, p.1251-1256, 1988.

PALUDAN, S.R.; ELLERMANN-ERIKSEN, S.; LOVMAND, J.; MOGENSEN, S.C. Interleukin-4-mediated inhibition of nitric oxide production in interferon-γ-treated and virus-infected macrophages. **Scand. J. Immunol.,** v. 49, p. 169- 176, 1999.

PAN, M. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of Ikb kinase and NFκB activation in macrophages. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 60, p. 1665-1676, 2000.

PANIZZA, S. Plantas que curam – cheiro de mato. IBRASA. São Paulo, 1997.

PARSLOW, T. G.; BAINTON, D. F. Imunidade Inata. In: STITES, D. P; TERR, A. I.; **Imunologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. cap.2, p.19-32.

PEDALINO, C.M.V.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T.; MARTINHO, K.S.; MASSOCO, C.; BONAMIM, L.V. Effect of *Atropa belladonna* and *Echinacea angustifolia* in homeopathic dilution on experimental peritonitis. **Homeopathy**, v.93, p. 193-198, 2004.

PENNANEN, R.S.; HAMON, J.; FALLER, B.; ALTMANN, KH.; GERTSCH, J. Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor-dependent and independent immunomodulatory effects. J Biol Chem 19;281(20): 14192-206. 1995.

PERIS, JB; STÜBING, G; VANACLOCHA, B. **Fitoterapia Aplicada**. Valencia: M.I. Colegio Oficial de Farmacêuticos, p. 158-9, 1995.

PICK, E. & KEISARI, Y. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. **J. Immunol. Methods**., 38: 61-70, 1980.

PICK, E. & MIZEL, D. Rapid microassay of measurement of superoxide and hydrogen producties. **J. Immunol. Methods**, 46: 211-26, 1981.

PODEROSO, J.J.; CARRERAS, M.C.; LISDERO, C.; SCHOPFER, F.; RIOBÓ, N.; PERALTA, J. Schock: conceptos para uma definición. **Med.** v. 58(4), p.341-349, 1998.

POLI, V. IL-6 Unique functions in Inflammation, Bone Metabolism, and B-cell neoplasias Reveled by Studies on IL-6 Deficient Mice, p.237-258 *In*: DURUM, S.K.; MUEGGE, K. **Cytokin.** New Jersey: Human Press, 1998. 482p.

POZETTI, G.L. Gotas Homeopáticas (Coletânia). Instituto Homeopático "François Lamasson", IHFL, Ribeirão Preto/SP, 101p. 1986.

POZETTI, G.L. Medicamentos Homeopáticos: Algumas monografias. IHFL, 2ª ed. Ribeirão Preto/SP, 76p. 1991.

PRANDO, C.C.; COLATRELLA, G. Fitoterapia científica e cosmética. Campinas-SP, 1984.

PUHLMANN, J.; ZENK, M.H.; WAGNER, H. Immunologically active polysaccharides of *Arnica montana* cell cultures. Phytochem. v. 30(4):1141-5, 1991.

RAMASARMA, T. H_2O_2 has a role in cellular regulation. **Indian J. Biochem. Biophys.,** v.27, n.5, p.269-274, 1990.

RAMSAY, A.J.; KOPF, M. IL-6 Gene Knockout Mice, p.227-236 *In*: DURUM, S.K.; MUEGGE, K. **Cytokin.** New Jersey: Human Press, 1998. 482p.

RANG, H. P.; DALE, M. M. & RITTER, J. M. **Farmacologia** – 3ª. Ed. Guanabara Reogam, 160-168, 1997.

RAO, M.K.; GHOSH, B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-α production in murine macrophages. **Immunopharmacol.,** v.21: 435-443, 1999.

REINHERZ, E.L.; SCHOLOSSMAN, S. The differentiation and function of human T lymphocytes. **Cell**, v. 19: 821, 1981.

RIBEIRO, L. T. C. Participação do óxido nítrico (NO) no efeito hipotensor / antihipertensivo da Cecropia glazioui Sneth e da Stâchytarphetâ cayennensis Vahl. XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -FESBE, 29/08 a 01/09/01, Caxambu, MG, Brasil. Anais 12.006.

RIZZINI, C.T. & MORS, B.W. Botânica Econômica Brasileira. 2ª ed., Editora EPU e EDUSP. São Paulo, 1976. p. 42.

RIZZO, J.A. Flora dos Estados de Goiás e Tocantins. 1ª ed., Editora UFG. Goiânia, 1996. 63p.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 5ª ed., Editora Manole, São Paulo, 1999. 423p.

ROMAGNANI, S. The Th1/th2 paradigm. **Imunol. Today**, v.18, n.6, p.263-266, 1997.

ROTTERBERG, M. E.; ÖRN, A. Conflicting roles of NO in *trypanosoma cruzi* infection. **Immunologist**. 5: 127-132, 1997.

SALEM, ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. **Immunopharmacol.,** v. 5(13-14), p. 1749-70, 2005.

SASADA, M.; JONHSTON, R.B. Macrophage microbicidal activity: correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and killing of *Candida* by macrophages. **J Exp Med**. 152: 85-98, 1980.

SERTIÉ, J.A.A. Pharmacological assay of Cordia verbenacea; Part 1. Antiinflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. **Plant. Med**., v. 54, p. 7-10, 1988.

SELIGMANN, I.C. The Anticancer Homeopathic Composite Canova Method is not Genotoxic for Human Lymphocytes in vitro. **J. Gen. Mol. Res**., v. 30, p. 36-42, 2003.

SHALABY, M.R.; AGGARWAL, B.B.; RINDER-KNECHT, E.; SVDERSKY, L.P.; FINKLE, B.S.; PALLADINO, M.A. Activation of human polymorphonuclear netrophil functions by interferon and tumor necrosis factors. **J. Immunol.** v. 135: 2069-2073, 1985.

STARK, G.R.; KERR, I.M.; WILLIANS, B.R.G.; SILVERMAN, R.H.; SCHREIBER, R.D. How cells respond to interferons. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 227-264, 1998.

SIEDLE, K.I.; HORI C.I.; CHAUDHURI Y.O. Flavonols from Heterotheca inuloides: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. **Indian. Biol**., v. 37, p. 1235-42, 2003.

SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed - Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, p. 349-51. 1999.

SONG, J.Y.; HAN, S.K.; SON, E.H.; PYO, S.N.; YUN, Y.S; YI, S.Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 857-865, 2002.

SONG, M.; KELLUM, J.A. Interleukin-6. **Crit. Care. Med.**, v. 33: 463-465, 2005.

TRINCHERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-γ). **Curr. Immunol.,** v. 9, p.17-23, 1997.

TRINCHIERI, G.; D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med**., v.178, n.3, p.1041-1048, 1995.

TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; UNANUE, E.R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficieny mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, n.8, p.3725-3729, 1993.

ULLMAN, D. **A Homeopatia – Medicina para o Século XXI.** São Paulo, Ed. Cultrix, 1995.

VALENTOVA, K.; MONCION, A.; WAZIERS, I.; ULRICHOVA, J. The effect of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts on rat hepatic metabolism. **Cell Biol. Toxicol.,** v. 20, p. 109-120, 1990.

VANE, J.R., MITCHELL, J.A. APPLETON, I. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Prod. Natl. Acad**. Sci. USA, v. 91, p. 2046-50, 1994.

VESSLY, D.A.L. Constituents in Heterotheca inuloides. Bioorg. Med. Chem. v. 5, p.865-71, 2000.

VILCEK, J.; PALOMBELLA, V.J.; HENRIKSEN-DESTEFANO, D.; SWENSON, C.; FEIMAN, R.; HIRAI, M. & TSUJIMOTO, M. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship two other polypeptide growth factors. **J.Exp.Med**., 163: 632, 1986.

XIE QW, CHO H, KASHIWABARA Y, BAUM M, WEIDNER JR, ELLISTON K, MUMFORD R, NATHAN C. Carboxyl terminus of inducible nitric oxide synthase. Contribution to NADPH binding and enzymatic activity. **Biol Chem.,** 269: 28500-28505, 1994.

XIE, Q.W., CHO, H.J., CALAYCAY, J., MUMFORD, R.A., SWIDEREK, K.M., LEE, T.D., DING, A., TROSO, T. & NATHAN, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Science, 256, 225 ± 228.

YUI, S.; UBUKATA, K.; HODONO, K.; KITAHARA, M.; MIMAKI, Y.; KURODA, M.; SASHIDA, Y.; YAMAZAKI, M. Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of Securidace. Int Immunopharmacol. (11): 1989-2000. 2001.

ZWILLING, B. S.; EISENSTEIN, T. K. Macrophage-pathogen interactions. New York: **Mar. Dek.,** p. 634, 1994.

http://www.amhb.org.br/nuke/modules

ASSOCIAÇÃO MÉDICA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. **Homeopatia - 25 anos como especialidade médica no Brasil.** Disponível em: Acesso em Fevereiro de 2006.

VIII - ANEXOS

CONTROLE DE QUALIDADE

A tintura-mãe de *Arnica montana* L. (Laboratório Schraiber) foi obtida por maceração das flores secas em etanol a 45%, apresentando cor castanho-esverdeado, com odor característico. A cromatografia em camada delgada revela a qualidade da tintura-mãe obtida. Através da diferença de migração da amostra comparada à distância de migração da solução padrão é possível calcular o Rf (fator de relação) que é a relação entre as distâncias percorridas pelo composto e pela frente do solvente.

$$Rf = \frac{a}{b}$$

sendo:

a = distância de migração da substância (centro da mancha à linha de partida)

b = distância percorrida pela fase móvel (frente do eluente, a partir do ponto de saída)

A solução padrão é o ácido cafeico a 1% que apresenta em seu cromatograma uma banda com fluorescência azul a 0,75; duas bandas azul esverdeada a 0,35 e 0,45; duas bandas azuis a 0,75 e 0,95 e uma banda vermelha na altura do “front” do solvente (POZETTI, 1999).

MÉTODO HAHNEMANNIANO

- Escalas Centesimal e Decimal

A – Drogas Solúveis

- Ponto de Partida: forma farmacêutica básica (tintura-mãe), dinamização anterior ou droga solúvel em insumo inerte hidroalcóolico a 20%, no mínimo, sendo obedecidas as escalas centesimal e decimal, respectivamente.

- **Insumo Inerte**: etanol em diferentes graduações. Nas três primeiras dinamizações, para a escala centesimal e nas seis primeiras para a escala decimal, será empregado etanol com mesmo titulo etanólico da tintura-mãe. No caso específico de drogas de origem mineral ou químico-farmacêutica será empregado etanol no mesmo titulo etanólico de seus dissolventes iniciais.

Nas preparações intermediárias, assim como para as de estoque, será empregado etanol 70% (p/p). Para a dispensação, quer na escala centesimal, quer na escala decimal, será utilizado etanol 30% (p/p).

- **Número de Frascos**: tantos quantas forem as dinamizações a serem preparadas.

- Volume: o liquido a ser dinamizado deverá ocupar 2/3 da capacidade do frasco utilizado na preparação.

- Número de Sucussões: 100

- Processo: diluição e sucussão. Manual ou mecânico.

- Processo Manual: a sucussão será executada através de movimento continuo e ritmado, no sentido vertical, com o antebraço, de modo que produza choque do fundo do frasco contra um anteparo semi-rígido.

- Processo Mecânico: a sucussão será feita em maquina que mantenha as características do processo manual.

- Técnica:

1. Dispor sobre a bancada tantos frascos quantos forem necessários para atingir a dinamização desejada.
2. Colocar em cada frasco volume de insumo inerte na proporção indicada, respectivamente nas escalas centesimal e decimal.
3. Acrescentar no 1º frasco 1 parte do ponto de partida e sucussionar 100 vezes. Obtém-se assim 1 CH ou 1 DH.
4. Transferir para o 2º frasco 1 parte da 1CH ou 1 DH e sucussionar 100 vezes. Obtém-se assim 2 CH ou 2 DH.
5. Transferir para o 3º frasco 1 parte da 2 CH ou 2 DH e sucussionar 100 vezes. Obtém-se assim a 3 CH ou 3 DH.

6. Proceder de forma idêntica para as preparações subseqüentes até atingir a dinamização desejada.

- Conservação:

Recipiente de vidro âmbar, bem fechado, protegido do calor e da luz direta.

B – Drogas Insolúveis

- Ponto de Partida: drogas insolúveis, quando sua solubilidade for inferior a 10% no insumo inerte liquido, e qualquer droga na preparação da LM.

- Insumo Inerte: lactose para a fase sólida e etanol, em diferentes graduações, para a fase liquida.

- Processo: trituração para a fase sólida, diluição e sucussão para a fase liquida. Manual ou mecânica.

- Técnica:

1. Dividir a quantidade total de lactose a ser utilizada, em 3 partes iguais. Uma terça parte de lactose será colocada em gral de porcelana e triturada para tapar os poros do gral.
2. Sobre este terço de lactose, coloca-se 1 parte do insumo ativo a ser triturado, obedecendo a escala centesimal ou decimal.

3. Homogeneizar com espátula de porcelana ou de aço inox.
4. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos.
5. Raspar, com espátula de porcelana ou de aço inox, o triturado aderido ao gral e ao pistilo, durante 4 minutos, homogeneizando-o.
6. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos, sem acréscimo de lactose.
7. Raspar o triturado durante 4 minutos.
8. Acrescentar a segunda terça parte de lactose.
9. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos.
10. Raspar o triturado durante 4 minutos.
11. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos, sem acréscimo de lactose.
12. Raspar o triturado durante 4 minutos.
13. Acrescentar o ultimo terço de lactose.
14. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos.
15. Raspar o triturado durante 4 minutos.
16. Triturar, vigorosamente, durante 6 minutos.
17. Raspar o triturado durante 4 minutos.
18. Este triturado será acondicionado em frasco bem fechado e protegido da luz solar direta, recebendo o nome da substancia medicinal e a designação de primeiro triturado: 1/100 ou 1/10. Ex: Petroleum 1 CH trit. Ou Petroleum 1 DH trit.
19. Para obtenção do segundo triturado, 1/10.000 ou 1/100, usar como insumo ativo 1 parte do primeiro triturado, para 100 ou 10 partes de lactose (respectivamente escala centesimal ou decimal) repetindo-se o procedimento anterior (itens de 3 a 17).

20. Este triturado será acondicionado em frasco bem fechado e protegido da luz solar direta, recebendo o nome da substância medicinal e a designação de segundo triturado 1/10.000 ou 1/100. Ex: Petroleum 2 CH trit. Ou Petroleum 2 DH trit.
21. Para Obtenção do terceiro triturado, 1/1.000.000 ou 1/1.000, usar como insumo ativo 1 parte do segundo triturado para 100 ou 10 partes de lactose (respectivamente escala centesimal ou decimal) repetindo-se o procedimento anterior (itens 3 a 17).
22. Este triturado será acondicionado em frasco bem fechado e protegido da luz solar direta, recebendo o nome da substância medicinal e a designação de terceiro triturado 1/1.000.000 ou 1/1.000. Ex: Petroleum 3 CH trit. ou Petroleum 3 DH trit.
23. No caso de trituração na escala decimal (DH), para obtenção das triturações subseqüentes, repetir o procedimento anterior ate a obtenção da 6º trituração (itens 3 a 17).
24. Para solubilizar a 3º trituração CH ou a 6º trituração DH, dissolver 1 parte da trituração em 80 partes de água destilada. Completar com 20 partes de álcool 96% (V/V) e sucssionar 100 vezes, obtendo assim, a 4 CH ou 7 DH em solução hidroalcoólica a 20% (p/p). A preparação com este grau de dinamização não será estocada. As demais dinamizações serão preparadas em solução hidroalcoólica a 70% (p/p) para estocar e solução hidroalcoólica a 30% (p/p) para dispensar.

- Conservação

Recipiente de vidro âmbar, bem fechado, protegido do calor, umidade e da luz direta.

- Prazo de Validade

A ser determinado, caso a caso.