

O papel do extrato EPs 7630 de *Pelargonium sidoides* na proliferação de linfócitos citotóxicos

The role of *Pelargonium sidoides* EPs 7630 extract in the proliferation of cytotoxic lymphocytes

DOI:10.34117/bjdv8n10-128

Recebimento dos originais: 12/09/2022

Aceitação para publicação: 11/10/2022

Ana Luiza Frare Polisello

Graduada em Biomedicina

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Endereço: Rua Vigário Carlos, 100, Uberaba - MG, Brasil, CEP: 38025-350

E-mail: d201720635@uftm.edu.br

Anna Cecília Dias Maciel Carneiro

Pós-Doutorada

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Endereço: Rua Vigário Carlos, 100, Uberaba - MG, Brasil, CEP: 38025-350

E-mail: annaceciamaciel@gmail.com

Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

Pós-Doutorada

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Endereço: Rua Vigário Carlos, 100, Uberaba - MG, Brasil, CEP: 38025-350

E-mail: sarah.tanaka@uftm.edu.br

Marcos Vinícius da Silva

Pós-Doutorado

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Endereço: Rua Vigário Carlos, 100, Uberaba - MG, Brasil, CEP: 38025-350

E-mail: marcos.silva@uftm.edu.br

Helio Moraes-Souza

Pós-Doutorado

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Endereço: Rua Vigário Carlos, 100, Uberaba - MG, Brasil, CEP: 38025-350

E-mail: helio.moraes@uftm.edu.br

Fernanda Bernadelli de Vito

Pós-Doutorado

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Endereço: Rua Vigário Carlos, 100, Uberaba - MG, Brasil, CEP: 38025-350

E-mail: fernanda.vito@uftm.edu.br

RESUMO

Pelargonium sidoides é uma importante planta com propriedades medicinais nativa da África do Sul utilizada principalmente no tratamento de infecções respiratórias e

comercializada sob a forma do extrato padronizado EPs 7630. Sua atividade farmacológica inclui efeitos antimicrobianos, antibacterianos, imunomoduladores e antivirais. Entretanto, falta compreender possíveis lacunas sobre as vias de atuação imunoduladoras, entre elas, se possui efeito na proliferação dos linfócitos citotóxicos. Portanto, o objetivo do trabalho foi analisar o efeito do extrato de *P. sidoides* na proliferação de linfócitos T CD8 e células natural killer (NK) e comparar estas taxas. Para isso, foram avaliadas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de 12 indivíduos saudáveis, sendo 6 do sexo feminino e 6 do masculino, entre 20 e 35 anos. A separação das PBMC foi realizada por centrifugação em gradiente de concentração com Ficoll-Paque™ PLUS e posteriormente incubadas com CFSE. Foram divididas nos seguintes grupos: células não tratadas, tratadas com 10µg/mL de extrato EPs 7630 de *P. sidoides* (TAKEDA) e controle veículo, contendo em cada um dos grupos células com e sem estímulo de CD3 e CD28. Por fim, as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Quanto aos resultados obtidos, tanto nas células NK como nos linfócitos T CD8 o tratamento com EPs 7630 sem estímulo não proporcionou diferença nos parâmetros analisados. Entretanto, quando as células foram estimuladas com CD3 e CD28, obtivemos resultados mais distintos. As células NK apresentaram uma maior taxa de expansão quando tratadas com EPs 7630, assim como no percentual de células não divididas e de segunda geração em relação às células não tratadas. Mesmo com estímulo, os linfócitos T CD8 não apresentaram variações significativas nos parâmetros avaliados quanto ao tratamento com EPs 7630. Comparando as taxas de proliferação de células NK e linfócitos T CD8 tratadas com e sem estímulo, os linfócitos T CD8 tiveram médias mais altas no percentual de células não divididas e as células NK no percentual de células de segunda geração. Concluímos então que o extrato comercial à base de *P. sidoides* é capaz de modular o sistema imune inato por meio da proliferação de células NK. Logo, espera-se que este trabalho contribua para a divulgação e conhecimento desta alternativa terapêutica.

Palavras-chave: pelargonium, proliferação de células, Linfócitos T, células matadoras naturais.

ABSTRACT

Pelargonium sidoides (*P. sidoides*) is an important plant with medicinal properties native of South Africa and mainly used for respiratory infections and sold as a standardized extract EPs 7630. Its pharmacological activity includes antimicrobial, antibacterial, immunomodulatory and antiviral effects. However, it has not been fully understood any possible gaps about immunomodulating action pathways, among them, if the extract has an effect on the proliferation of cytotoxic lymphocytes. Therefore, the aim of this work was to analyze the effect of *P. sidoides* extract on T CD8 lymphocytes proliferation and natural killer cells (NK) and compare these rates. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 12 healthy individuals, 6 females and 6 males, between 20 and 35 years old were evaluated. The PBMC separation was performed by concentration gradient centrifugation with Ficoll-Paque™ PLUS and then incubated with CFSE. They were divided into the following groups: non-treated cells, treated with 10µg/mL EPs 7630 of *P. sidoides* (TAKEDA) and vehicle control, contained in each one of the groups cells with and without CD3 and CD28 stimulation. Finally, the samples were acquired on the FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Regarding the results obtained, in both NK cells and T CD8 lymphocytes treatment with EPs 7630 without stimulation did not provide any difference in the analyzed parameters. However, when cells were stimulated with CD3 and CD28, the results were more distinct. NK cells showed a higher expansion

rate when treated with EPs 7630, as well as in the percentage of non-divided cells and second-generation cells regarding non-treated cells. Even with stimulation, CD8 T lymphocytes did not show significant variation in the parameters evaluated regarding treatment with EPs 7630. Comparing the proliferation rates of NK cells and CD8 lymphocytes treated with and without stimulus, the T had higher averages in the percentage of undivided cells and NK cells in the percentage of second-generation cells. We conclude that the commercial extract based on *P. sidoides* is able to modulate the innate immune system through the proliferation of NK cells. Therefore, it is expected that this work will contribute to the dissemination and knowledge of this therapeutic alternative.

Keywords: pelargonium, cell proliferation, T-Lymphocytes, killer cells.

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia é definida como a aplicação terapêutica de plantas inteiras, em partes (flor, folha, caule, raiz) ou como extrato e cuja origem se dá principalmente no conhecimento e uso popular, exemplificado pelo uso de *Pelargonium sidoides* (LACCOURREYE *et al.*, 2017). Esta planta se tornou amplamente conhecida no ano de 1897, após o inglês Charles Henry Stevens a introduzir na Inglaterra como alternativa de tratamento para tuberculose (BLADT; WAGNER, 2007).

No Brasil, os fitoterápicos relacionados ao *P. sidoides* registrados na ANVISA são produzidos sob a forma do extrato padronizado EPs 7630 (MAZZUCO *et al.*, 2014), comercializados como Umckan® e Kaloba® na forma de solução oral com concentração 825mg/mL. O seu uso se expandiu para além dos usos tradicionais originais contra distúrbios gastrointestinais para incluir infecções do trato respiratório, como bronquite aguda, asma, sinusite e amigdalofaringite (BRASIL, 2004; BRASIL, 2007).

Avaliando-se a sua atividade farmacológica, já foram relatados efeitos antivirais e antibacterianos, bem como notável capacidade imunomodulatória (BRENDLER; VAN WYK, 2008; MOYO; VAN STADEN, 2014). In vitro foi observada uma melhora na fagocitose, inibição da adesão e crescimento bacteriano (BEIL; KILIAN, 2007; CONRAD *et al.*, 2007). Além disso, foi considerado também um potente inibidor da adesão viral ao interferir com a replicação de alguns vírus (MICHAELIS; DOERR; CINATL JR, 2011; WALTHER; DÖRING; SCHMIDTKE, 2020). Já suas atividades imunomodulatórias são mediadas principalmente pelo estímulo da liberação de óxido nítrico, interferons e de citocinas envolvidas nos mecanismos de defesa do hospedeiro (KOLODZIEJ, 2011; PERIĆ *et al.*, 2020).

Dentre os mecanismos de estímulos da resposta imune inata, destaca-se o estímulo

da atividade das células natural killer (NK) (KOŁODZIEJ; KIDERLEN, 2007). Estas células, juntamente com os linfócitos T CD8 são classificadas como linfócitos citotóxicos e são responsáveis por mediar a resposta contra vírus e células neoplásicas. Ambos são linfócitos efetores e matam as células-alvo por vários mecanismos, sendo o principal deles o citotóxico, no qual compartilham a via de apoptose mediada por perforinas e granzimas e é justamente por isso que podem ser classificados juntos (TRAPANI; SMYTH, 2002).

Apesar de notável potencial antimicrobiano, pouco se sabe ainda sobre a atuação do *P. sidoides* na indução da resposta imune de indivíduos saudáveis. Em vista disso, este estudo se propôs a analisar se os linfócitos citotóxicos têm a proliferação estimulada frente ao tratamento com EPs 7630.

2 METODOLOGIA

2.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo de caráter biológico e experimental. Nele foram incluídos 12 indivíduos saudáveis, sendo 6 do sexo feminino e 6 do sexo masculino entre 20 e 35 anos, sem histórico de neoplasias, doenças autoimunes e doenças infecciosas crônicas ou ativas no momento da inclusão do estudo. Após a aplicação e aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram coletados 15mL de sangue de cada participante do projeto, por meio de punção venosa. As amostras foram processadas no Laboratório de Pesquisas Hematológicas da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UFTM.

2.2 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi realizada por centrifugação em gradiente de concentração com Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Por esta técnica adiciona-se o Ficoll e logo em seguida o sangue do paciente, cuidadosamente. Após centrifugação, é possível a visualização de várias camadas no tubo, sendo da camada inferior para a superior: eritrócitos, granulócitos, Ficoll, PBMC e plasma. Dessa forma, conseguimos obter as células de interesse, que passam por 2 lavagens com o meio RPMI incompleto. Depois da última lavagem, adicionamos 1mL de meio RPMI incompleto e utilizando a câmara de Neubauer padronizamos uma quantidade média de 1.600.000 células por paciente. Posteriormente, estas células foram incubadas com CFSE (éster succinimidílico da carboxifluoresceína)

a 0,01 μ M e deixadas 5 minutos a temperatura ambiente com o tubo envolto por papel alumínio, seguida de 3 lavagens com o meio RPMI completo, que é suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram então colocadas em diferentes condições, sendo uma delas com meio RPMI completo suplementado por 10 μ g/mL de extrato EPs 7630 de *Pelargonium sidoides* (TAKEDA), outra apenas meio RPMI completo, portanto, sem tratamento. E por fim, o controle veículo, que é o meio RPMI completo suplementado com etanol a 12%. Colocadas as células em seus respectivos meios na placa de cultura, os ensaios foram realizados em duplicata, totalizando 4 poços com tratamento, 4 sem tratamento e 4 de controle veículo. Em 2 poços de cada grupo, foi adicionado estímulo de CD3 e CD28 (BD Biosciences). Todas as células foram mantidas em estufa de CO₂ a 5% a 37°C por 48 horas, sem complementação de meio de cultura.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

A cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 50 μ L para quantificação de proliferação (detecção de CFSE) e para a identificação das células NK e T CD8 (com os anticorpos anti-CD3 APC, anti-CD56 PEcy7 e anti-CD8 PEcy5 (BD Pharmingen™, CA, EUA). Foram adquiridos 3000 eventos de cada amostra em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) para a determinação do tipo celular e da expressão de CFSE.

2.4 ANÁLISE DOS DADOS

A proliferação celular foi analisada utilizando o software FlowJo© 10.8.1 (Becton Dickinson) e quanto as parâmetros analisados, nos baseamos nas definições do mesmo software, que define como taxa de divisão o número total de divisões dividido pelo número de células no início da cultura; taxa de expansão como o número total de células dividido pelo número de células no início da cultura; taxa de proliferação como o número total de divisões dividido pelo número de células que entraram em divisão e por fim, taxa de replicação como o número total de células divididas dividido pelo número de células que entraram em divisão. Para o cálculo, foram utilizados os valores de células não divididas e as suas duas gerações, baseando-se na fluorescência do CFSE. Já a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o GraphPad Prism© 9.3.1, LLC. Os testes estatísticos utilizados foram o teste t pareado ou Wilcoxon de acordo com a normalidade dos dados e as análises foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

2.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Número: 50569621.5.0000.5154).

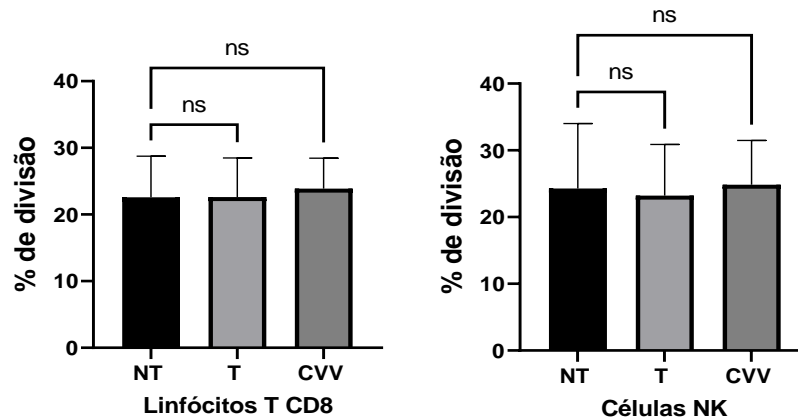
3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DOS LINFÓCITOS CITOTÓXICOS SEM ESTÍMULO

Os parâmetros analisados a seguir foram baseados na quantificação de linfócitos T CD8 e células NK divididos entre três grupos de células, sendo não tratadas, tratadas com 10µg/mL de EPs 7630 e controle veículo, todas sem estímulo, após 48h de cultura.

Ao analisarmos o percentual de divisão de linfócitos T CD8 entre os grupos, observamos que as médias foram semelhantes (22,57 vs 22,61 vs 23,88, respectivamente), não havendo diferença significativa (NT vs T $p=0,9828$ e NT vs CVV $p=0,4860$). O mesmo ocorreu com as células NK, cujas médias foram NT= 24,27; T= 23,22; CVV= 24,86, também sem diferença significativa (NT vs T $p=0,7445$ e NT vs CVV $p=0,8250$) (Figura 1).

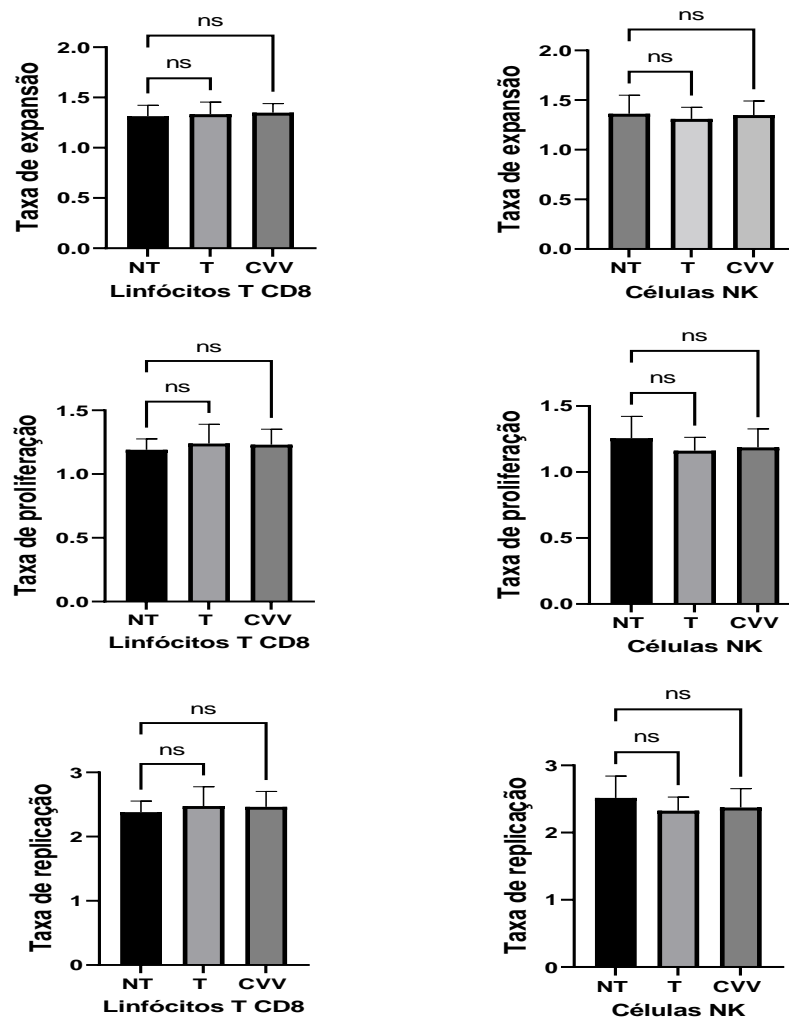
Figura 1. Percentual de divisão dos linfócitos T CD8 e células NK sem estímulo.



NT: células não tratadas. T: células tratadas com EPs 7630 na concentração de 10µg/mL. CVV: controle veículo. ns: não significativo

Quanto à taxa de expansão, de proliferação e replicação as médias também foram semelhantes tanto em relação aos linfócitos T CD8 como nas células NK. Dessa forma, não houve diferença significativa (Figura 2 e Tabela 1).

Figura 2. Taxa de expansão, proliferação e replicação dos linfócitos T CD8 e células NK sem estímulo.



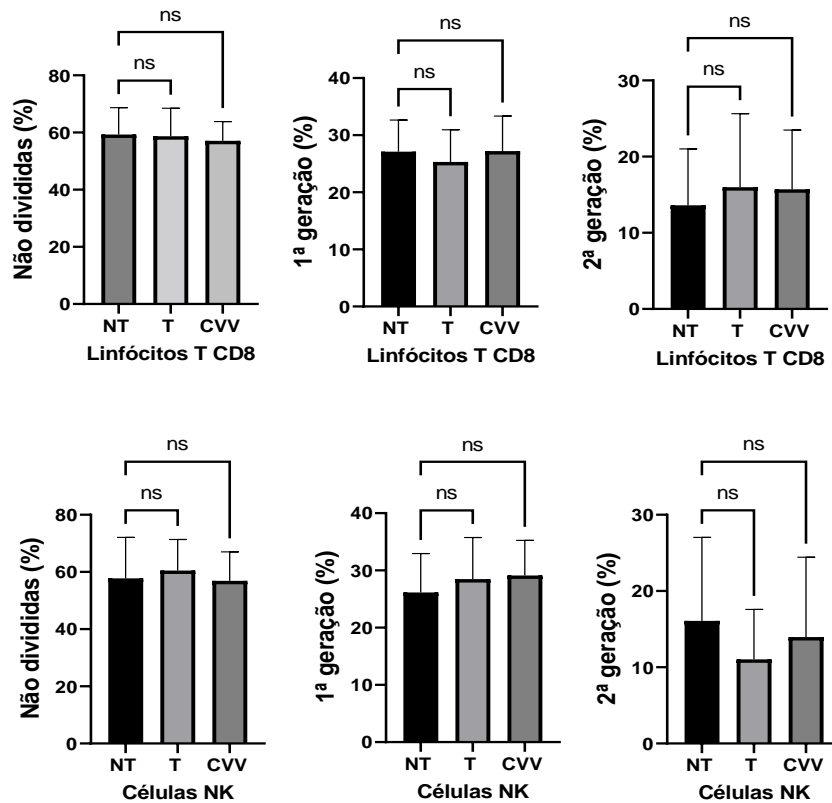
NT: células não tratadas. T: células tratadas com EPs 7630 na concentração de 10µg/mL. CVV: controle veículo. ns: não significativo.

Tabela 1. Comparação das médias das taxas de expansão, proliferação e replicação dos linfócitos T CD8 e células NK sem estímulo.

Médias	T CD8			NK		
	NT	T	CVV	NT	T	CVV
EXPANSÃO	1,314	1,335	1,349	1,362	1,311	1,349
PROLIFERAÇÃO	1,190	1,239	1,231	1,257	1,163	1,187
REPLICAÇÃO	2,382	2,476	2,464	2,515	2,327	2,373
T student (Valor de p)	NT vs T		NT vs CVV		NT vs CVV	
EXPANSÃO	0,2670		0,1166		0,3378	
PROLIFERAÇÃO	0,3207		0,0976		0,0682	
REPLICAÇÃO	0,3372		0,0954		0,0709	

Já em relação ao percentual das células não divididas, primeira e segunda geração, as médias dos linfócitos T CD8 e células NK estão levemente distintas entre os grupos. Porém, nenhuma delas houve significância estatística (Figura 3 e Tabela 2).

Figura 3. Percentual das células não divididas, primeira e segunda geração dos linfócitos T CD8 e células NK sem estímulo.



NT: células não tratadas. T: células tratadas com EPs 7630 na concentração de 10µg/mL. CVV: controle veículo. ns: não significativo

Tabela 2. Comparação das médias do percentual das células não divididas, de primeira e segunda geração dos linfócitos T CD8 e células NK sem estímulo.

Médias	T CD8			NK		
	NT	T	CVV	NT	T	CVV
NÃO DIVIDIDAS	59,27	58,70	57,08	57,77	60,48	56,91
1ª GERAÇÃO	27,12	25,33	27,21	26,14	28,49	29,13
2ª GERAÇÃO	13,60	15,98	15,71	16,08	11,03	13,96
T student (Valor de p)	NT vs T		NT vs CVV	NT vs T		NT vs CVV
NÃO DIVIDIDAS	0,7721		0,3515	0,5669		0,8256
1ª GERAÇÃO	0,5760		0,9722	0,4345		0,2467
2ª GERAÇÃO	0,2246		0,0682	0,0812		0,4627

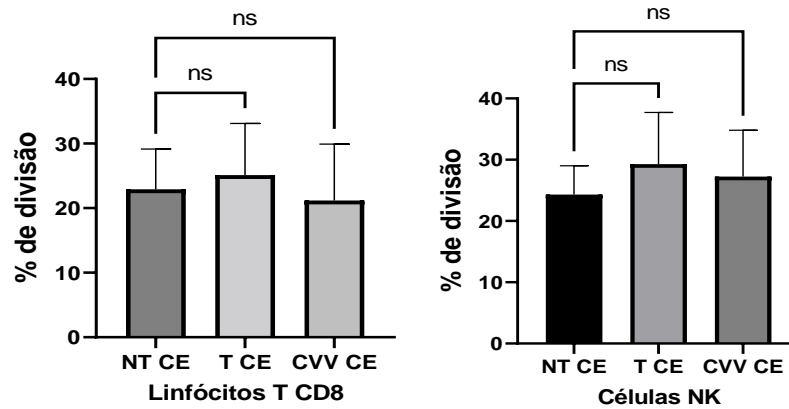
3.2 ANÁLISE DOS LINFÓCITOS CITOTÓXICOS COM ESTÍMULO

Os parâmetros analisados a seguir foram baseados na quantificação de linfócitos T CD8 e células NK divididos entre três grupos de células, sendo não tratadas, tratadas com 10µg/mL de EPs 7630 e controle veículo, todas com estímulo de CD3 e CD28, após 48h de cultura.

Analisando o percentual de divisão de linfócitos T CD8 entre os grupos, observa-se que as médias estão levemente distintas (22,91 vs 25,12 vs 21,20, respectivamente), porém, não havendo diferença significativa (NT vs T p= 0,3360 e NT vs CVV p= 0,6523).

Igualmente ocorreu com as células NK, cujas médias foram NT= 24,31; T= 29,30; CVV= 27,24, também sem diferença significativa (NT vs T $p= 0,0841$ e NT vs CVV $p= 0,1999$) (Figura 4).

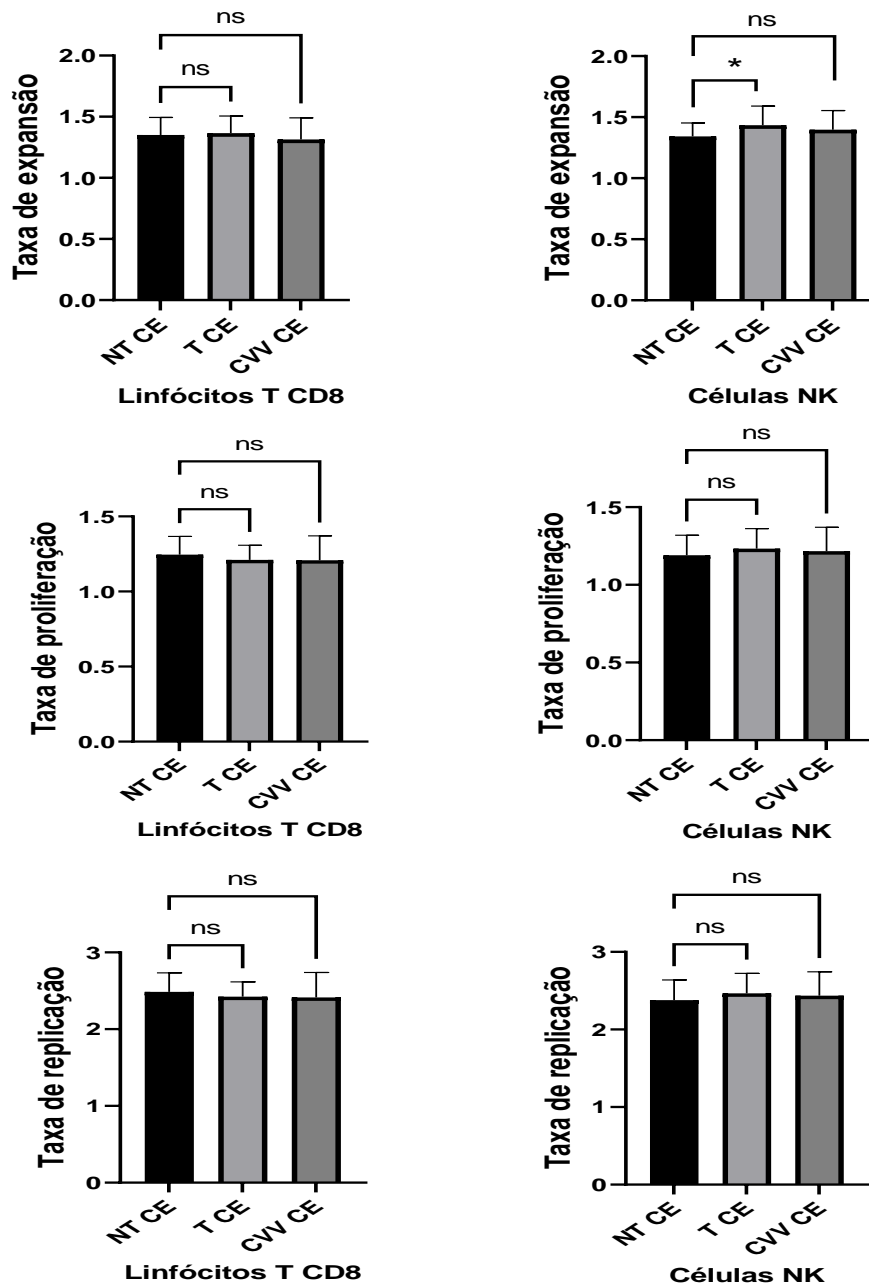
Figura 4. Percentual de divisão dos linfócitos T CD8 e células NK com estímulo de CD3 e CD28.



NT CE: células não tratadas com estímulo de CD3 e CD28. T CE: células tratadas com EPs 7630 na concentração de 10 μ g/mL e estímulo de CD3 e CD28. CVV CE: controle veículo com estímulo de CD3 e CD28. ns: não significativo

Em relação à taxa de expansão, os linfócitos T CD8 tiveram suas médias semelhantes, diferente do que ocorreu com as células NK, que além disso, tiveram diferença significativa entre a relação NT vs T. Já quanto às taxas de proliferação e replicação as médias foram semelhantes tanto em relação aos linfócitos T CD8 como nas células NK. Portanto, não houve diferença significativa (Figura 5 e Tabela 3).

Figura 5. Taxa de expansão, proliferação e replicação dos linfócitos T CD8 e células NK com estímulo CD3 e CD28.



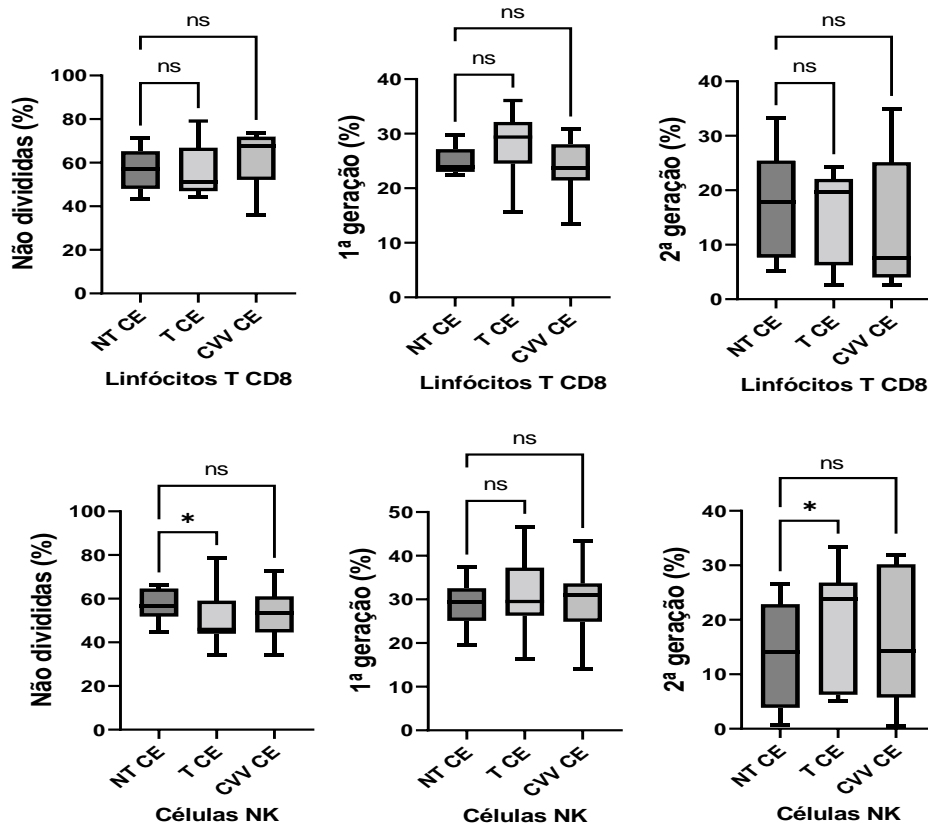
NT CE: células não tratadas com estímulo de CD3 e CD28. T CE: células tratadas com EPs 7630 na concentração de 10µg/mL e estímulo de CD3 e CD28. CVV CE: controle veículo com estímulo de CD3 e CD28. ns: não significativo. * p= 0,0427.

Tabela 3. Comparação das médias das taxas de expansão, proliferação e replicação dos linfócitos T CD8 e células NK com estímulo CD3 e CD28.

Médias	T CD8			NK		
	NT CE	T CE	CVV CE	NT CE	T CE	CVV CE
EXPANSÃO	1,350	1,366	1,314	1,342	1,435	1,397
PROLIFERAÇÃO	1,245	1,211	1,208	1,190	1,233	1,217
REPLICAÇÃO	2,487	2,423	2,413	2,380	2,466	2,435
T student (Valor de p)	NT CE vs T CE	NT CE vs CVV CE	NT CE vs T CE	NT CE vs CVV CE		
EXPANSÃO	0,6317	0,6060	0,0427	0,0831		
PROLIFERAÇÃO	0,2611	0,3704	0,1523	0,3020		
REPLICAÇÃO	0,2889	0,3704	0,1384	0,2734		

Por fim, quanto ao percentual das células não divididas, primeira e segunda geração, as medianas dos linfócitos T CD8 estão distintas entre os grupos. Porém, nenhuma delas houve significância estatística. Ao observar as células NK, as medianas também estão distintas, entretanto, nas relações entre NT CE vs T CE das células não divididas e segunda geração, houve significância (Figura 6 e Tabela 4).

Figura 6. Percentual das células não divididas, primeira e segunda geração dos linfócitos T CD8 e células NK com estímulo CD3 e CD28.



NT CE: células não tratadas com estímulo de CD3 e CD28. T CE: células tratadas com EPs 7630 na concentração de 10µg/mL e estímulo de CD3 e CD28. CVV CE: controle veículo com estímulo de CD3 e CD28. ns: não significativo. Não divididos * p= 0,0286. 2ª geração * 0,0161.

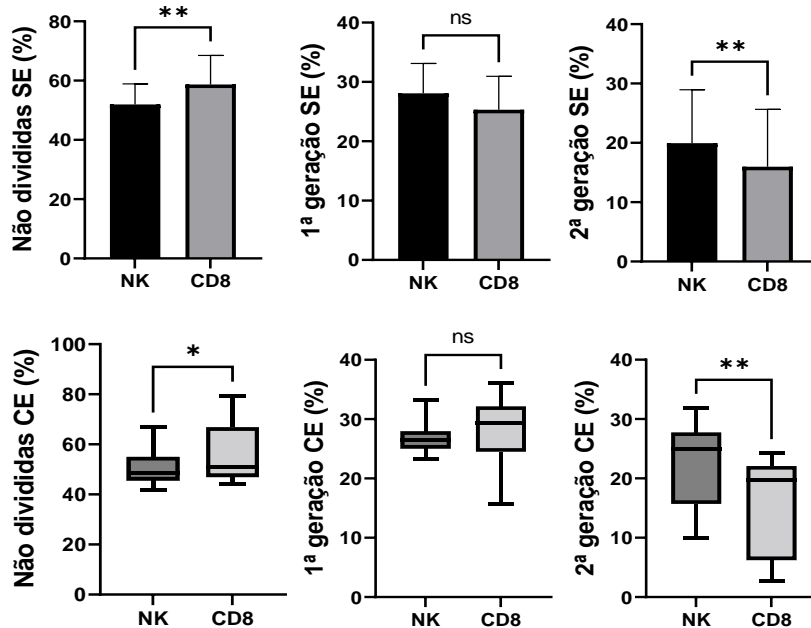
Tabela 4. Comparação das medianas do percentual das células não divididas, primeira e segunda geração dos linfócitos T CD8 e células NK com estímulo CD3 e CD28.

Medianas	T CD8			NK		
	NT CE	T CE	CVV CE	NT CE	T CE	CVV CE
NÃO DIVIDIDAS	57,27	51,10	67,55	56,71	45,99	53,57
1ª GERAÇÃO	23,99	29,37	23,71	29,42	29,53	30,94
2ª GERAÇÃO	17,88	19,68	7,65	14,08	23,79	14,23
Mann-Whitney (valor de p)	NT CE vs T CE		NT CE vs CVV CE	NT CE vs T CE		NT CE vs CVV CE
NÃO DIVIDIDAS	0,6572		0,4577	0,0286		0,1541
1ª GERAÇÃO	0,3228		0,5984	0,5567		0,6889
2ª GERAÇÃO	0,4961		0,4785	0,0161		0,1514

3.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS GERAÇÕES DOS LINFÓCITOS CITOTÓXICOS COM TRATAMENTO

Comparando diferentes gerações dos linfócitos T CD8 e das células NK tratadas com 10µg/mL de EPs 7630 por 48h com e sem estímulo, obtivemos resultados distintos. Quanto ao percentual de células não divididas, os linfócitos T CD8 apresentaram médias maiores e significativas, com e sem estímulo. Em relação à primeira geração, as médias e medianas das de ambas as células foram ligeiramente distintas nas duas condições, porém sem significância. Por fim, na segunda geração as médias e medianas foram mais altas nas células NK com e sem estímulo, apresentando significância estatística (Figura 7 e Tabela 5).

Figura 7. Comparação do percentual das diferentes gerações entre linfócitos T CD8 e células NK tratados com 10µg/mL de EPs 7630, com e sem estímulo de CD3 e CD28.



NK: células natural killer. CD8: linfócitos T CD8. CE: com estímulo de CD3 e CD28. SE: sem estímulo de CD3 e CD28. ns: não significativo. Não divididas SE ** p= 0,0034. Não divididas CE * p= 0,0181. 2ª geração SE ** p=0,0015. 2ª geração CE ** p= 0,0039.

Tabela 5. Médias e medianas do percentual das células não divididas, primeira e segunda geração dos linfócitos TCD8 e células NK tratados com 10µg/mL de EPs 7630, com e sem estímulo de CD3 e CD28.

Médias e Medianas	SEM ESTÍMULO (SE)			COM ESTÍMULO (CE)		
	NK	TCD8	p	NK	TCD8	p
NÃO DIVIDIDAS	51,98	58,70	0,0034	*52,68	*58,15	0,0181
1ª GERAÇÃO	28,07	25,33	0,0564	*26,43	*29,37	0,7344
2ª GERAÇÃO	19,95	15,98	0,0015	*24,95	*19,68	0,0039

* Medianas

4 DISCUSSÃO

O *Pelargonium sidoides* é uma planta cujo potencial curativo é amplamente conhecido, porém sua propriedade farmacológica ainda possui várias lacunas, principalmente quanto ao seu efeito imunomodulador. Na literatura, os artigos publicados até o momento são relacionados à ação do *P. sidoides* diante de um patógeno, então pode-se definir que este estudo possui uma abordagem inédita, pois analisa a indução da proliferação de linfócitos citotóxicos em indivíduos saudáveis. Portanto, torna-se uma limitação a maior correlação dos resultados encontrados com projetos anteriores. Entretanto, nos baseamos em um estudo com a mesma linha de pesquisa, ainda não publicado, de Cardoso (2022), onde avalia o efeito imunomodulador da EPs 7630 frente à linfócitos citotóxicos de indivíduos saudáveis. Nele, com apenas 4h de tratamento com a dose de 10µg/mL, notou-se um aumento de perforina na forma ativa. Conclui-se então que esta dose tem potencial para agir nestes linfócitos. Por outro lado, em relação à proliferação celular tanto de linfócitos T quanto de células NK em amostras tratadas e não tratadas não foi observada diferença significativa. Dessa forma, só reforça a importância do presente estudo, onde o tempo de tratamento foi prolongado, intensificando as chances de resultados significantes.

Os ensaios de proliferação para os linfócitos citotóxicos foram conduzidos baseados na determinação da quantidade de 3H-timidina incorporada ao DNA replicante de células em cultura. A incorporação de timidina fornece uma medida quantitativa da taxa de síntese de DNA, que, em geral, é diretamente proporcional à taxa de divisão celular. O CFSE, corante fluorescente utilizado, entra nas células, forma ligações covalentes com proteínas citoplasmáticas e, então, fica impedido de sair. Assim, toda vez que uma célula se divide, seu conteúdo de corante cai pela metade e, desse modo, é possível determinar se as células sofreram divisão, bem como estimar o número de

duplicações sofridas por meio da citometria de fluxo (ABBAS; PILLAI; LICHTMAN, 2019), que neste caso foram demonstradas pelo percentual de células não divididas, primeira e segunda geração.

Quanto aos resultados obtidos, tanto nas células NK como nos linfócitos T CD8 o tratamento com 10µg/mL de EPs 7630 sem estímulo não proporcionou diferença nos parâmetros analisados, havendo apenas discretas oscilações entre as suas médias e medianas. Já em relação às células estimuladas com CD3 e CD28, obtivemos resultados mais distintos. As células NK apresentaram uma taxa de expansão significativa analisando as células tratadas com 10µg/mL de EPs 7630 e não tratadas, assim como no percentual de células não divididas e de segunda geração. Mesmo com estímulo, os linfócitos T CD8 também não tiveram valores significantes. Porém, ao fazermos a última análise entre taxas de proliferação de linfócitos T CD8 e células NK tratadas com *Pelargonium sidoides*, com e sem estímulo de CD3 e CD28, ambas as células tiveram significância. Em relação ao percentual de células não divididas, com e sem estímulo, os linfócitos T CD8 tiveram médias mais altas. Por outro lado, quanto ao percentual de células de segunda geração, com e sem estímulo, as células NK tiveram médias e medianas mais altas, portanto, mais divisões ocorreram e conseqüentemente, maior proliferação.

Deste modo, comprova-se a ação deste fitoterápico na imunidade inata, pela maior taxa de expansão e gerações das células NK. Assim, podendo relacionar este achado com o projeto Koch e colaboradores (2002), que demonstrou aumento da síntese de interferon-beta e ativação da atividade das células NK, porém em células de osteossarcoma.

Os linfócitos T CD8 são da imunidade adaptativa, conseqüentemente, precisam interagir com as células apresentadoras de antígenos e com coestimuladores para serem ativados. Esta ativação ocorre então através do receptor de células $\alpha\beta$ -T (complexo TCR), sendo necessária para a sua proliferação *in vitro*. Portanto, o tratamento de células T com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anticorpos anti-CD28 fornece um sinal coestimulador que aciona o TCR, que pode ser usado para ativação induzida por antígeno. Já as células NK, como são da imunidade inata, não precisam de sensibilização para agir contra antígenos e sua ativação se inicia principalmente pelo estímulo de interleucinas. Sendo que ambos possuem a via de apoptose mediada por perforinas e granzimas (ABBAS; PILLAI; LICHTMAN, 2019), o tempo torna-se uma hipótese para a diferença de proliferação entre eles, pois nossa análise foi de apenas 48 horas. Além disso, o nosso número amostral menor pode ser uma justificativa também, pois um maior número de

pacientes analisados diminuiria a variabilidade entre os valores, sobretudo por cada indivíduo responder ao tratamento de uma forma.

Os resultados encontrados nas condições testadas (PBMCs incubadas com EPs 7630 a 10µg/mL por 48 horas) demonstraram que o extrato comercial de *P. sidoides* é capaz de estimular significativamente as células NK de indivíduos saudáveis. Esse é um achado bastante relevante considerando que ela faz parte da imunidade inata, portanto, a primeira linha de defesa do organismo e neste caso mediando principalmente a resposta contra vírus e células neoplásicas.

Há estudos que demonstram interferência do *Pelargonium sidoides* no mecanismo de infecção do SARS-CoV-2, responsável por causar a doença coronavírus. Existem relatos de inibição da sua entrada no hospedeiro, bem como da replicação, citopatogenicidade ou até hipóteses do seu extrato se tornar uma alternativa de tratamento e profilaxia (GAJEWSKI *et al.*, 2021; IACOVELLI *et al.*, 2022; PAPIES *et al.*, 2021). Dessa forma, mesmo o presente estudo não tendo enfoque no efeito antiviral, evidências desta planta atuando em uma doença de tamanha relevância atual torna ainda mais importante a elucidação de suas propriedades ainda não tão compreendidas.

Em vista de todos esses pontos abordados, potencializa-se ainda mais a importância de maiores estudos acerca das propriedades imunomodulatórias do *P. sidoides*, tornando-se uma linha de pesquisa promissora e de grande relevância terapêutica.

5 CONCLUSÃO

A incubação das PBMCs de indivíduos saudáveis com EPs 7630 a 10µg/mL por 48 horas possui potencial na indução da proliferação dos linfócitos citotóxicos, porém de forma distinta. Estimulou de forma significativa especialmente as células NK em relação à taxa de expansão, diferente do que ocorreu com as células T CD8. Porém, ao comparar ambas as células quanto à resposta ao tratamento, os linfócitos T CD8 apresentaram uma média maior de células não divididas. Já as células NK, quanto ao percentual de células de segunda geração.

Por fim, concluímos então que o *P. sidoides* é um fármaco capaz de estimular a resposta imune inata, tornando-o uma interessante alternativa terapêutica sendo que é uma célula da primeira linha de defesa que age contra vírus e células neoplásicas. Logo, reforça a importância de novos estudos acerca dos seus mecanismos de ação, especialmente sobre as células NK, que tiveram destaque no presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia**: celular e molecular. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595150355/epubcfi/6/2%5B%3Bvnd.vst.idref%3Dcover%5D!/4/2/2%5Bcover01%5D/2%4051:2>>. Acesso em: 16 fev. 2022.
- BEIL, W.; KILIAN, P. EPs® 7630, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. **Phytomedicine**, v. 14, n.6, p. 5-8, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17188478/>>. Acesso em: 17 fev. 2022.
- BLADT, S.; WAGNER, H. From the Zulu medicine to the European phytomedicine *Umckaloabo*. **Phytomedicine**, v.14, n.1, p. 2-4, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17239572/>>. Acesso em: 17 fev. 2022.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. (ANVISA). Registro do medicamento Kaloba. Brasília (D.F). 2004. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?nomeProduto=Kaloba>>. Acesso em: 02 mai. 2022.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. (ANVISA). Registro do medicamento Umckan. Brasília (D.F). 2007. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?nomeProduto=Umckan>>. Acesso em: 02 mai. 2022.
- BRENDLER, T.; VAN WYK, B.-E. A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 420-433, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18725280/>>. Acesso em: 05 abr. 2022.
- CARDOSO, I. D. Avaliação do efeito imunomodulador de EPs®7630 frente à linfócitos citotóxicos de indivíduos saudáveis. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba, 2022.
- CAREDDU, D.; PETTENAZZO, A. *Pelargonium sidoides* extract EPs 7630: a review of its clinical efficacy and safety for treating acute respiratory tract infections in children. **International journal of general medicine**, v. 11, p. 91-98, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5849386/>>. Acesso em: 28 abr. 2022.
- CONRAD, A.; HANSMANN, C.; ENGELS, I.; DASCHNER, Franz D.; FRANK, U. Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs® 7630) improves phagocytosis, oxidative burst, and intracellular killing of human peripheral blood phagocytes in vitro. **Phytomedicine**, v. 14, p. 46-51, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17184983/>>. Acesso em: 28 abr. 2022.

DI VITO C, MIKULAK J, ZAGHI E, PESCE S, MARCENARO E, MAVILIO D. NK cells to cure cancer. **Seminars in immunology**. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31085114/>>. Acesso em: 28 abr. 2022.

GAJEWSKI, Aleksander *et al.* Potential of herbal products in prevention and treatment of COVID-19. Literature review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112150, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34507112/>>. Acesso em: 05 abr. 2022.

IACOVELLI, Federico *et al.* Interaction of *Pelargonium sidoides* Compounds with Lactoferrin and SARS-CoV-2: Insights from Molecular Simulations. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 9, p. 5254, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35564648/>>. Acesso em: 05 abr. 2022.

KOŁODZIEJ, H. Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine *Umckaloabo*®. **Phytomedicine**, v. 14, n.6, p. 9-17, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17188477/>>. Acesso em: 17 fev. 2022.

KOCH, E.; LANZENDORFER-GOOSSENS, H.; WOHN, C. Stimulation of interferon (INF)-beta-synthesis and natural killer (NK) cell activity by an aqueous-ethanolic extract from roots of *Pelargonium sidoides* (*Umckaloabo*). **Naunyn-Schmeideberg Arch Pharmacol**. 2002. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/313693911_Stimulation_of_interferon_INF-beta-synthesis_and_natural_killer_NK_cell_activity_by_an_aqueous-ethanolic_extract_from_roots_of_Pelargonium_sidoides_Umckaloabo_In_Abstracts_of_the_43rd_Spring_Meeting_o>. Acesso em: 28 abr. 2022.

KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. In vitro evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation *EPs 7630*. **Phytomedicine**. v. 14, n.6, p. 18-26, 2007. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17188480/>>. Acesso em: 17 fev. 2022.

KOŁODZIEJ, H. Antimicrobial, antiviral and immunomodulatory activity studies of *Pelargonium sidoides* (*EPs*® 7630) in the context of health promotion. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 10, p. 1295-1314, 2011. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27721327/>>. Acesso em: 17 fev. 2022.

LACCOURREYE, O.; WERNER, A.; LACCOURREYE, L.; BONFILS, P. Benefits, pitfalls and risks of phytotherapy in clinical practice in otorhinolaryngology. **European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases**, v. 134, n. 2, p. 95-99, 2017. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27914909/>>. Acesso em: 28 abr. 2022.

MAZZUCO, B. *et al.* *Pelargonium sidoides* dc.(umckaloabo): histórico do uso, aspectos taxonômicos, ecológicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. **Tecnologia e Ambiente**, v. 21, p. 282-300, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/291199432_PELARGONIUM_SIDOIDES_DC_UMCKALOABO_HISTORICO_DO_USO_ASPECTOS_TAXONOMICOS_ECO>

LOGICOS FITOQUIMICOS FARMACOLOGICOS E TOXICOLOGICOS>. Acesso em: 14 dez. de 2021.

MICHAELIS, M.; DOERR, H. W.; CINATL JR, J. Investigation of the influence of *EPs® 7630*, a herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides*, on replication of a broad panel of respiratory viruses. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 384-386, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21036571/>>. Acesso em: 17 fev. 2022.

MOYO, M.; VAN STADEN, J. Medicinal properties and conservation of *Pelargonium sidoides* DC. **Journal of ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 243-255, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24463034/>>. Acesso em: 17 fev. 2022.

PAPIES, Jan *et al.* Antiviral and Immunomodulatory Effects of *Pelargonium sidoides* DC. Root Extract *EPs® 7630* in SARS-CoV-2-Infected Human Lung Cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34759825/>>. Acesso em: 28 abr. 2022.

PERIĆ, A. *et al.* Effects of *Pelargonium sidoides* extract on chemokine levels in nasal secretions of patients with non-purulent acute rhinosinusitis. **Journal of Drug Assessment**, v. 9, n. 1, p. 145-150, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33209511/>>. Acesso em: 28 abr. 2022.

TRAPANI, J.A.; SMYTH, M.J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.10, p.735-747, 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri911#:~:text=Perforin%2Fgranzyme%2Dinduced%20apoptosis%20is,homeostasis%20of%20the%20lymphoid%20compartment>>. Acesso em: 17 fev. 2022.

WALTHER, C.; DÖRING, K.; SCHMIDTKE, M. Comparative in vitro analysis of inhibition of rhinovirus and influenza virus replication by mucoactive secretolytic agents and plant extracts. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33357221/>>. Acesso em: 28 abr. 2022.