

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LORRAYNE RODARTE SOARES

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO EPS[®]7630 DE *PELARGONIUM*
SIDOIDES NA ATIVIDADE TUMORICIDA DE LINFÓCITOS CITOTÓXICOS
CONTRA CÉLULAS JURKAT**

Uberaba

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LORRAYNE RODARTE SOARES

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO EPs[®] 7630 DE *PELARGONIUM*
SIDOIDES NA ATIVIDADE TUMORICIDA DE LINFÓCITOS CITOTÓXICOS
CONTRA CÉLULAS JURKAT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Bernadelli De Vito
Coorientadoras: Prof^ª. Dr^ª. Anna Cecília Dias Maciel Carneiro e Prof^ª. Dr^ª. Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine

Uberaba
2024

Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

S655a Soares, Lorryne Rodarte
Análise da influência do extrato EPs®7630 de *Pelargonium sidoides* na atividade tumoricida de linfócitos citotóxicos contra células Jurkat / Lorryne Rodarte Soares. -- 2024.
53 p.: il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Bernadelli De Vito
Coorientadoras: Profa. Dra. Anna Cecília Dias Maciel Carneiro
Profa. Dra. Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine

1. Neoplasias hematológicas. 2. Fitoterapia. 3. Citotoxicidade imunológica. 4. Imunomodulação. I. De Vito, Fernanda Bernadelli. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.15

LORRAYNE RODARTE SOARES

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO EPS® 7630 DE *PELARGONIUM SIDOIDES* NA ATIVIDADE TUMORICIDA DE LINFÓCITOS CITOTÓXICOS CONTRA CÉLULAS JURKAT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada” (Linha de Pesquisa: Imunobiologia e Imunoterapia das Neoplasias) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 01 de novembro de 2024

Banca Examinadora:

Dra. Fernanda Bernadelli De Vito – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Graziella Ribeiro De Sousa



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA BERNADELLI DE VITO, Técnico-Administrativo em Educação**, em 01/11/2024, às 14:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **SARAH CRISTINA SATO VAZ TANAKA, Técnico-Administrativo em Educação**, em 01/11/2024, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **Graziella Ribeiro de Sousa, Usuário Externo**, em 01/11/2024, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1377865** e o código CRC **27CCA3C4**.

Dedico este trabalho a todos os educadores que, com dedicação e paixão, moldam mentes e transformam vidas. Agradeço por inspirarem a busca pelo conhecimento e pelo crescimento pessoal.

AGRADECIMENTOS

O mestrado para mim representou não apenas a oportunidade de ampliar meu conhecimento em Imunologia e Hematologia e seguir o sonho de ser docente, mas também uma jornada de crescimento pessoal com muita persistência e resiliência durante o processo, para que eu não desistisse. Ao longo desse percurso, enfrentei desafios que me fizeram questionar minha capacidade e determinação, mas com o apoio daqueles que me cercam, encontrei forças para seguir em frente. Essas pessoas fizeram com que eu acreditasse no meu potencial e me apoiaram ao longo desse percurso. Gostaria de expressar a minha profunda gratidão a todos que contribuíram de forma significativa para a realização desta pesquisa. Primeiramente, agradeço aos meus pais, Cynthia e Almir, cujo amor, apoio incondicional e encorajamento foram fundamentais para que eu pudesse alcançar este marco na minha vida. Obrigada por sempre desejarem o melhor para mim e pelo esforço incansável de vocês para que eu pudesse estar aqui neste momento. Agradeço meu irmão, Matheus, pela amizade, companheirismo e incentivo. Seu apoio foi crucial durante esse período. Quero agradecer a minha gatinha Cristal, por seu companheirismo constante. A presença dela me trouxe conforto nos momentos mais desafiadores.

Agradeço à minha orientadora, Fernanda Bernadelli De Vito, por ter me concedido a oportunidade de entrar no laboratório de Hematologia e por sempre me estender a mão quando mais precisei. Sou imensamente grata pela oportunidade de adquirir conhecimento e crescer sob a orientação de uma pessoa extraordinária, da qual sempre tenho algo a aprender. Nunca esquecerei a confiança que depositou em mim e o apoio constante.

Agradeço à minha coorientadora, Anna Cecília Dias Maciel Carneiro, pelo apoio nas horas difíceis (e pelas broncas necessárias também) e por sempre me ouvir quando mais precisei. Você sempre diz que quando me vê, lembra daquela menina que entrou no laboratório de Histologia e não sabia nada de cultura, mas com o tempo se tornou a melhor no que se propôs. Mas eu também me vejo em você, pois entrei no mestrado sem conhecer muito a Hematologia e a cultura celular, mas saio dele com o conhecimento que ultrapassa as paredes da UFTM e parte desse aprendizado vem do que você me ensinou.

Agradeço imensamente aos meus amigos “de vida”, do mestrado e laboratório de Hematologia, a amizade de vocês tornaram esse período mais leve. Em especial, gostaria de agradecer aos meus amigos do laboratório, Lucas Fernandes e Marianne Faye, pela parceria, troca de conhecimento e pelos momentos compartilhados. Agradeço a Dr^a. Sarah Tanaka e ao Dr. Helio Moraes pelo valioso conhecimento compartilhado, que enriqueceu minha jornada

acadêmica. Agradeço por terem me acolhido tão bem no laboratório e por toda ajuda que ofereceram. Muito obrigada! Quero estender meus agradecimentos ao laboratório de Imunologia por ter disponibilizado seu espaço, bem como ao laboratório de Farmacologia por sua colaboração fundamental em meu trabalho, em especial à professora Karina Ferrazzoli e à professora Thaís Farnesi. Muito obrigada por todo o apoio e suporte oferecidos. Gostaria de expressar meu profundo agradecimento à UFTM, bem como às agências de fomento, CAPES e FAPEMIG, pelo suporte e recursos oferecidos que tornaram possível a realização deste trabalho. Acredito que investir na educação é investir no progresso e no futuro, pois a educação tem o poder de mudar realidades e impulsionar descobertas.

E ressalto que sem as contribuições de cada um, nada disso seria possível.

“Só se pode alcançar um grande êxito, quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A resposta imune, sobretudo àquela relacionada aos linfócitos T CD8 e células NK, é essencial para combater células tumorais. Estudos recentes destacam o papel de fitoterápicos no tratamento complementar em neoplasias, sendo o extrato de *Pelargonium sidoides* um exemplo promissor, com propriedades imunomoduladoras. Os estudos sobre o potencial citotóxico e antineoplásico dos linfócitos tratados com *P. sidoides* são escassos na literatura. Nesse sentido, o presente estudo buscou analisar o efeito de *Pelargonium sidoides* (extrato EPs[®] 7630) sobre a capacidade de linfócitos citotóxicos eliminar *in vitro* células tumorais de origem hematológica, bem como realizar o *screening* fitoquímico do extrato, e determinar o IC₅₀ em células de linhagem tumoral Jurkat e PBMCs. Foi realizada a análise qualitativa metabólitos em extrato etanólico comercial das raízes de *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630) Kaloba[®]. Para a determinação do IC₅₀ foi avaliado o tratamento por 24 horas nas concentrações 40, 400, 4.000, 40.000 e 400.000 µg/mL. A quantificação da morte celular foi realizada por citometria de fluxo com a marcação de 7-amino-actinomicina D (7-AAD). Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis e da linhagem tumoral Jurkat foram cultivadas e expostas a diferentes tempos e concentrações do extrato EPs[®] 7630 para avaliar a citotoxicidade. A quantificação de morte também foi realizada pela marcação com 7-AAD, identificada por citometria de fluxo. Os resultados do estudo mostraram que o extrato EPs[®] 7630, obtido das raízes de *Pelargonium sidoides*, contém uma variedade de metabólitos secundários como cumarinas, fenois, flavonoides, flavonas e flavanonas. As PBMCs apresentaram um IC₅₀ de 60.470 µg/mL e a linhagem tumoral Jurkat, 63.700 µg/mL do extrato. No experimento em que PBMCs tratados por 24 horas com EPs[®] 7630, houve maior percentual de morte de células Jurkat pelas células tratadas com 100 µg/mL, comparado às células não tratadas e àquelas tratadas com 10 µg/mL. O tratamento nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL promoveu maior morte de células tumorais em relação ao grupo não tratado no ensaio por 4 horas em tratamento concomitante. Quanto à co-cultura por 6 horas, observou-se que houve maior percentual de morte de células Jurkat naquelas tratadas com EPs[®] 7630 tanto na proporção 10:1, quanto 30:1. Os resultados aqui apresentados sobre a potencialização da capacidade antitumoral de PBMCs pelo extrato EPs[®] 7630 de *P. sidoides*, estabelecem uma nova compreensão sobre a viabilidade da utilização do fármaco como terapia complementar às neoplasias. **Palavras-chave:** Neoplasias hematológicas; fitoterapia; *Pelargonium sidoides*; EPs[®] 7630; citotoxicidade; imunomodulação.

ABSTRACT

The immune response, especially that related to CD8 T lymphocytes and NK cells, is essential to combat tumor cells. Recent studies highlight the role of phytotherapeutics in the complementary treatment of neoplasms, with *Pelargonium sidoides* (*P. sidoides*) extract being a promising example, with immunomodulatory properties. Studies on the cytotoxic and antineoplastic potential of lymphocytes treated with *P. sidoides* are scarce in the literature. In this sense, the present study sought to analyze the effect of *P. sidoides* (EPs[®] 7630 extract) on the capacity of cytotoxic lymphocytes to eliminate tumor cells of hematologic origin *in vitro*, as well as to perform phytochemical screening of the extract and determine the IC₅₀ in Jurkat tumor cell line and PBMCs. Qualitative analysis of metabolites was performed on a commercial ethanolic extract of the roots of *P. sidoides* (EPs[®] 7630) Kaloba[®]. To determine the IC₅₀, treatment for 24 hours at concentrations of 40, 400, 4,000, 40,000 and 400,000 µg/mL was evaluated. Cell death was quantified by flow cytometry with 7-amino-actinomycin D (7-AAD) labeling. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals and the Jurkat tumor cell line were cultured and exposed to different times and concentrations of the EPs[®] 7630 extract to evaluate cytotoxicity. Death was also quantified by 7-AAD labeling, identified by flow cytometry. The results of the study showed that the EPs[®] 7630 extract, obtained from the roots of *Pelargonium sidoides*, contains a variety of secondary metabolites such as coumarins, phenols, flavonoids, flavones and flavanones. PBMCs presented an IC₅₀ of 60,470 µg/mL and the Jurkat tumor cell line, 63,700 µg/mL of the extract. In the experiment in which PBMCs were treated for 24 hours with EPs[®] 7630, there was a higher percentage of Jurkat cell death by cells treated with 100 µg/mL, compared to untreated cells and those treated with 10 µg/mL. Treatment at concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL promoted greater tumor cell death compared to the untreated group in the assay for 4 hours in concomitant treatment. Regarding the co-culture for 6 hours, it was observed that there was a higher percentage of death of Jurkat cells in those treated with EPs[®] 7630 in both the 10:1 and 30:1 ratio. The results presented here regarding the enhancement of the antitumor capacity of PBMCs by the EPs[®] 7630 extract of *P. sidoides* provide new insights into the potential of using this drug as a complementary therapy for neoplasms.

Keywords: Hematologic neoplasms; phytotherapy; *Pelargonium sidoides*; EPs[®] 7630; cytotoxicity; immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de citotoxicidade antitumoral das células NK.	18
Figura 2 - Representação da diferenciação das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea.	20
Figura 3 - Aspectos microscópicos das células Jurkat.	23
Figura 4 - Pelargonium sidoides e EPs® 7630.	25
Figura 5 - Determinação qualitativa de cumarinas em extrato alcoólico comercial de EPs® 7630, pelo método de hidróxido de potássio e luz UV.	33
Figura 6 - Determinação qualitativa de alcaloide em extrato alcoólico comercial de EPs® 7630, pelos métodos de Mayer, Bertrand, Dragendorff e Wagner.	33
Figuras 7 e 8 - Determinação qualitativa de taninos em extrato alcoólico comercial de EPs® 7630, pelo teste de Braymer.	34
Figura 9 - Índice de citotoxicidade do extrato etanólico EPs® 7630 (Pelargonium sidoides) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e em células de linhagem Jurkat.	35
Figura 10 - Comparação da capacidade de indução de morte pelo controle veículo do extrato etanólico EPs® 7630 (Pelargonium sidoides) em células de linhagem Jurkat e em células não tratadas	36
Figura 11 - Efeito do extrato EPs® 7630 em linfócitos citotóxicos tratados por 24 horas sobre a indução de morte em células de linhagem Jurkat	37
Figura 12 - Efeito do extrato EPs® 7630 em linfócitos citotóxicos sobre a indução de morte em células de linhagem Jurkat em co-cultura por 4 horas	38
Figura 13 - Efeito do extrato EPs® 7630 em linfócitos citotóxicos sobre a indução de morte em células de linhagem Jurkat em co-cultura por 4 horas, sob estímulo de interleucina 2 (IL-2).	39
Figura 14 - Efeito do extrato EPs® 7630 em linfócitos citotóxicos sobre a indução de morte em células de linhagem Jurkat em co-cultura por 6 horas	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação qualitativa de cumarinas, alcaloides, taninos, fenóis, flavonol, flavonas e flavanonas em extrato comercial etanólico EPs® 7630

35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal do Nível Superior

EPs[®] 7630 - Extrato alcóolico patenteado de *Pelargonium sidoides*

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

GI₅₀ - Concentração que causa 50% de inibição do crescimento celular - *cell growth inhibition*

HIV-1 - do inglês *Human Immunodeficiency Virus* - Vírus da Imunodeficiência Humana 1

IC₅₀ - Concentração inibitória das 50% de células viáveis - *inhibitory concentration*

IFN- β - Interferon beta

IFN- γ - Interferon gamma

IKK - do inglês *I κ B kinase complex* - complexo I κ B kinase

IL-1, IL-17, IL-22 e IL-23 - Interleucina 1, Interleucina 17, Interleucina 22 e Interleucina 23

INCA - Instituto Nacional de Câncer

KOH - Hidróxido de potássio

LC₅₀ - Concentração que mata 50% das células viáveis - *lethal concentration*

NF- κ B - do inglês *Nuclear factor kappa B* - fator nuclear kappa B

NK - do inglês *natural killer* - exterminadoras naturais

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBMCs - do inglês *peripheral blood mononuclear cells* - células mononucleares do sangue periférico

RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute*.

SFB - Soro fetal bovino

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alpha

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. RESPOSTA IMUNE E AS NEOPLASIAS MALIGNAS	17
2.2. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	19
2.2.1 Células Jurkat	22
2.3. TRATAMENTO FITOTERÁPICO	23
2.2.3 EPs® 7630	24
3. HIPÓTESE	27
3.1. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. GERAL	28
4.2. ESPECÍFICOS	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	29
5.2. SCREENING FITOQUÍMICO	29
5.2.1 Identificação da presença de cumarinas	29
5.2.2 Identificação da presença de alcaloides	30
5.2.3 Identificação da presença de taninos	30
5.2.4 Identificação da presença de fenol total	30
5.2.5 Identificação da presença de flavonóis, flavonas e flavanonas	30
5.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E CULTIVO DAS CÉLULAS DE LINHAGENS TUMORAIS	31
5.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	31
5.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORICIDA DE LINFÓCITOS CITOTÓXICOS TRATADOS COM EPs® 7630	32
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
6. RESULTADOS	33
6.1. SCREENING FITOQUÍMICO	33
6.2. CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE PELARGONIUM SIDOIDES (EPs® 7630) EM PBMCs E CÉLULAS JURKAT	35
6.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CITOLÍTICA DE LINFÓCITOS CITOTÓXICOS TRATADOS COM EPs® 7630	36
7. DISCUSSÃO	41
8. CONCLUSÃO	46
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias hematológicas compreendem um grupo diversificado de doenças relacionadas ao sangue, medula óssea e órgãos linfoides, como leucemias, mieloma múltiplo e linfomas. Atualmente, a abordagem terapêutica relacionada a estas doenças envolve uma variedade ou combinações de tratamentos, tais como quimioterapia, radioterapia, imunoterapias, transplante de medula óssea e uso de células CAR-T (Auberger *et al.*, 2020).

As terapias convencionais e seus aprimoramentos farmacológicos proporcionaram uma melhora significativa no prognóstico dos pacientes, chegando inclusive à cura em vários casos. Entretanto, a resistência aos tratamentos atualmente disponíveis continua sendo um desafio na prática clínica, contribuindo de maneira significativa para as recidivas e o insucesso das terapias. De fato, independentemente do tipo de tratamento utilizado, as células malignizadas constantemente desenvolvem estratégias para se adaptarem e sobreviverem às abordagens terapêuticas (Hofmann *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, observou-se um crescente interesse no uso de terapias alternativas e complementares para o tratamento do câncer em geral, incluindo o uso de produtos naturais como os fitoterápicos. Essa busca não reflete apenas alternativas de baixo custo e fácil acesso, mas também visa aliviar os efeitos colaterais, a resistência aos tratamentos e a melhora da saúde geral do paciente (Yin, *et al.*, 2013; Izuegbuna, *et al.*, 2021).

Um estudo investigou as interações farmacodinâmicas entre medicamentos anticâncer e tratamentos alternativos, como a fitoterapia. Reconhecendo a complexidade do tratamento do câncer, o trabalho enfatizou a importância das terapias convencionais, especialmente a quimioterapia, no combate às metástases. Além disso, observou-se uma crescente tendência entre os pacientes de associar fitoterápicos ao tratamento convencional (Okem *et al.*, 2023).

O extrato obtido das raízes de *Pelargonium sidoides* (patenteado como EPs[®] 7630) teve suas propriedades medicinais relatadas ao longo de vários anos pela população nativa do sul da África. Já foram identificados no extrato diversos metabólitos secundários, como flavonoides, taninos, fenois e ácidos gálicos (Kolodziej *et al.*, 2003; Seidel e Taylor, 2004). Foi também demonstrado que *P. sidoides* estimula as células *natural killer*; a liberação de fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- β , aumenta a atividade fagocitária e possui a capacidade de intensificar a frequência dos batimentos ciliares de células nasais *in vitro* (Kayser *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2002; Neugebauer *et al.*, 2005; Kolodziej *et al.*, 2007).

Pesquisas envolvendo fitoterápicos podem levar à identificação de medicamentos com propriedades antitumorais que sejam de fácil administração, contribuindo para o tratamento de doenças como o câncer. (Costa-Lotufo *et al.*, 2010). Nesse contexto, este estudo investiga o papel do extrato de *Pelargonium sidoides*, reconhecido por suas propriedades medicinais, em potencializar a atividade de linfócitos citotóxicos contra células tumorais de origem hematológica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

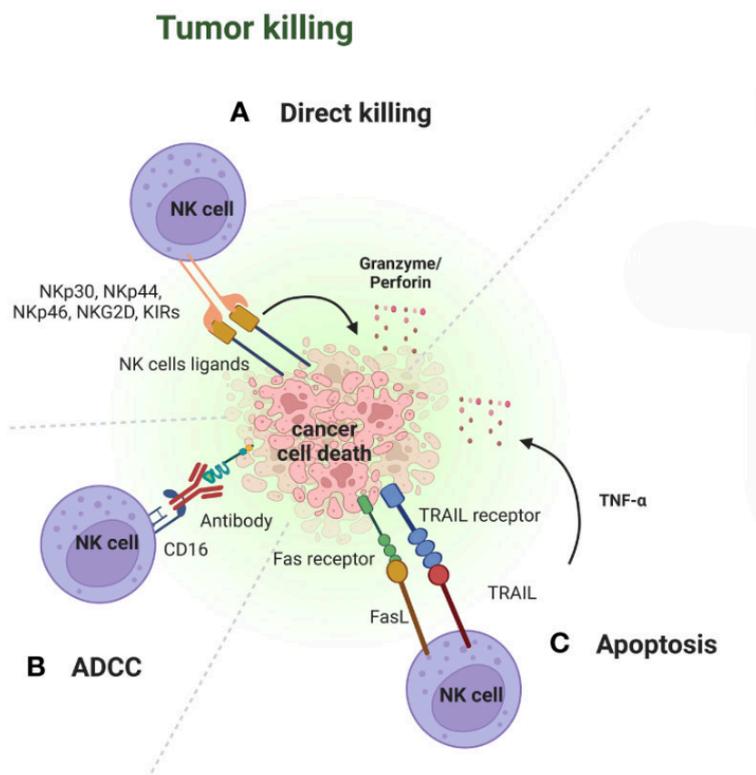
2.1. RESPOSTA IMUNE E AS NEOPLASIAS MALIGNAS

Os linfócitos T CD8 e as células *natural killer* (NK), juntos denominados linfócitos citotóxicos (LTCs), atuam como efetores essenciais na defesa contra células infectadas por vírus ou células tumorais (Sun *et al.*, 2011). Após o reconhecimento do alvo, LTCs podem eliminá-lo por citotoxicidade direta, formando uma sinapse imunológica que direciona grânulos citotóxicos para a célula-alvo, bem como podem ocorrer interações com o ligante FAS que induz a morte celular por apoptose (Lettau *et al.*, 2011; Braumuller *et al.*, 2013).

A ativação dos linfócitos T CD8 começa com a interação com células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, permitindo o reconhecimento do antígeno por meio do MHC de classe I e estimulando a produção de citocinas, como a IL-2. Essa citocina é fundamental para a diferenciação das células T em efetoras ou de memória (Meuer *et al.*, 1987; Verbist *et al.*, 2016). Além disso, sinais coestimuladores, como o receptor CD28 e o ligante B7, são importantes para a ativação destas células (Esensten *et al.*, 2016).

As células NK reconhecem suas células-alvo utilizando receptores específicos em sua superfície. Os receptores inibitórios das células NK, como os que se ligam a moléculas de MHC classe I (MHC-I), ajudam a distinguir entre células saudáveis e células potencialmente danosas. Quando as células apresentam MHC-I, os receptores inibitórios geralmente sinalizam que a célula é saudável, inibindo a ativação da célula NK. Se a célula-alvo não expressa MHC-I ou apresenta sinais de estresse, os receptores ativadores das células NK podem desencadear uma resposta citotóxica (Vivier e Anfossi, 2004; Long, 2008). Elas também podem reconhecer células marcadas por anticorpos através do receptor CD16a, desencadeando a citotoxicidade mediada por anticorpos, um mecanismo importante para a eficácia de terapias com anticorpos, como o rituximabe (Hatjiharissi *et al.*, 2007) (Figura 1).

Figura 1 - Mecanismos de citotoxicidade antitumoral das células NK.



Fonte: Fantini *et al.*, 2023.

(A) Citotoxicidade direta: as células NK liberam granzimas e perforinas para destruir células tumorais. **(B) Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC):** receptores CD16 ligam-se a anticorpos direcionados aos tumores, ativando a morte celular. **(C) Apoptose:** ligantes das células NK (TRAIL e FasL) interagem com receptores de morte nas células tumorais, induzindo apoptose com apoio de TNF- α .

Nesse sentido, as células NK possuem propriedades antitumorais distintas das células T, pois não necessitam de ativação específica por antígeno e conseguem reconhecer uma variedade de células neoplásicas. Elas também controlam metástases e auxiliam na resposta imunológica adaptativa. Ao contrário das células T, as células NK são seguras em transplantes alogênicos e são eficazes contra tumores que reduzem a expressão de MHC-I, o que as torna uma ferramenta promissora para complementar outras terapias oncológicas (Olson *et al.*, 2010; Simonetta *et al.*, 2017; Myers *et al.*, 2021; Laskowski *et al.*, 2022).

Embora existam células imunes ativadas em pacientes com neoplasias malignas, o sistema imunológico muitas vezes falha em prevenir tumores e limitar sua disseminação (Dunn *et al.*, 2004). Isso se deve ao fato que muitos tumores desenvolveram mecanismos para escapar do sistema imune do hospedeiro. As células tumorais se assemelham às células saudáveis em alguns aspectos, o que dificulta o reconhecimento pelo sistema imunológico.

Além disso, as células neoplásicas sofrem mutações que reduzem a expressão de antígenos, dificultando ainda mais o reconhecimento pelo sistema imunológico. A alta taxa de proliferação pode sobrecarregar o sistema imune, desencadeando um processo de anergia dos linfócitos citotóxicos, ao tentar eliminar todas as células malignas (Schwartz, 2003).

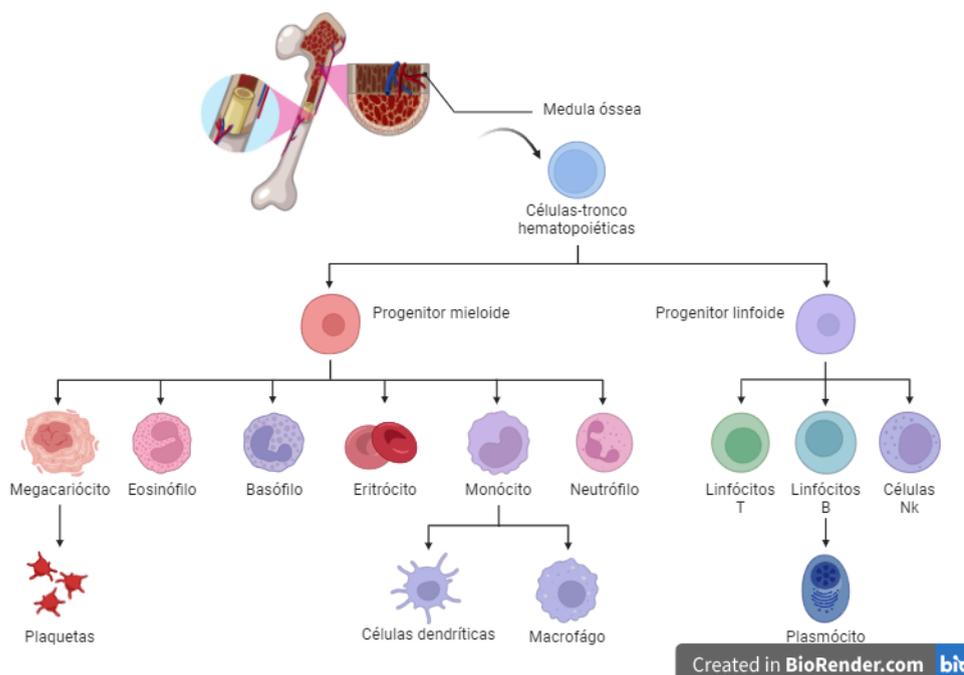
Essa capacidade das células neoplásicas em escapar do sistema imunológico também está relacionada à resistência aos tratamentos, o que representa um desafio significativo na luta contra o câncer. Esse fenômeno pode ocorrer de diversas maneiras, incluindo a ativação de vias de sinalização que promovem a sobrevivência das células tumorais, a alteração de proteínas-alvo dos tratamentos, e a capacidade de se adaptar a ambientes adversos (Ghosh *et al.*, 2019; Vasan *et al.*, 2019). Essa capacidade de resistência é uma das razões que tornam o tratamento do câncer tão desafiador.

2.2. NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

As neoplasias hematológicas são um grupo heterogêneo caracterizado pelo crescimento anormal de células sanguíneas em diferentes estágios de maturação. A classificação das malignidades hematológicas é realizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e aborda diversos critérios como a origem da célula neoplásica (mieloide ou linfoide), seu desenvolvimento agudo ou crônico, além de suas características clínicas, morfológicas e genéticas específicas (Mendéz-Ferrer *et al.*, 2020). A diferenciação das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea está esquematizada na Figura 2.

As neoplasias mieloides incluem doenças mielodisplásicas e doenças mieloproliferativas. As doenças mielodisplásicas são um grupo de distúrbios hematológicos que afetam a produção e a maturação das células sanguíneas na medula óssea, resultando em células anormais. Por outro lado, as doenças mieloproliferativas envolvem uma produção excessiva e descontrolada de células sanguíneas, que podem levar a complicações como trombose ou hemorragias. Exemplos dessas condições incluem a policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose primária, leucemia mieloide crônica e a leucemia mieloide aguda (Swerdlow *et al.*, 2017; Khoury *et al.*, 2022).

Figura 2 - Representação da diferenciação das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea.



Fonte: BioRender adaptado pela autora, 2024.

As neoplasias linfoproliferativas abrangem subtipos de linfomas, mielomas múltiplos e leucemias. A última edição do *Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* da OMS, a 5ª edição publicada em 2022, trouxe atualizações importantes sobre linfomas. A classificação dos linfomas foi revisada para refletir novas descobertas em genética, biologia celular e imunologia. Linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin foram mantidos, mas com subtipos mais bem definidos e critérios diagnósticos refinados. As leucemias agudas, por sua vez, são caracterizadas pela perda da capacidade maturativa do clone neoplásico, sendo classificadas como mielóides, fenótipo misto e leucemias linfoblásticas de células B e T (Zago *et al.*, 2014; Swerdlow *et al.*, 2017; OMS, 2022).

Segundo os dados do GLOBOCAN 2022, a estimativa mundial de novos casos de neoplasias hematológicas são 82.469 casos de linfoma de Hodgkin, 553.389 casos de outros subtipos de linfomas, 187.952 casos de mieloma múltiplo e 487.294 casos de leucemias. Em relação às estimativas de mortes, os números são 22.733 mortes de linfoma de Hodgkin, 250.679 mortes por outros subtipos de linfomas, 121.388 mortes por mielomas múltiplos e 305.405 mortes por leucemias. Além disso, é importante ressaltar que as neoplasias hematológicas são mais prevalentes em homens do que em mulheres, conforme observado nos dados epidemiológicos (Bray *et al.*, 2024).

No Brasil, a incidência das neoplasias hematológicas é significativa. Conforme os dados do INCA para o triênio de 2023 a 2025, estima-se que ocorrerão 11.540 novos casos de leucemia por ano, resultando em um risco de 5,33 por 100 mil habitantes. A leucemia é a décima mais comum entre os tipos de câncer, variando em frequência entre as regiões, sendo a sexta mais frequente na Região Norte e Nordeste, a 11ª na Região Sudeste, a 12ª na Região Centro-Oeste e a 14ª na Região Sul. Entre as mulheres, a leucemia ocupa a sexta posição na Região Norte e a nona na Região Nordeste, enquanto nas demais regiões varia de 11ª a 13ª posição (INCA, 2022).

O linfoma de Hodgkin tem uma estimativa de 3.080 novos casos anuais, com um risco de 1,41 por 100 mil habitantes, sendo o 20º tipo de câncer mais comum. Em homens, é o 16º mais frequente em todas as regiões, com maior incidência na Região Sul e um risco de 1,41 por 100 mil habitantes. Para mulheres, é o 18º mais comum nas Regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e o 19º na Região Nordeste. Já o linfoma não-Hodgkin, com 12.040 novos casos anuais e um risco de 5,57 por 100 mil habitantes, ocupa a nona posição geral. Em homens, é o oitavo mais frequente na Região Sul e varia de nona a décima posição nas demais regiões. Entre as mulheres, o linfoma não-Hodgkin é o oitavo na Região Sul e o 12º a 14º nas demais regiões. Esses dados ressaltam a importância de estratégias eficazes de diagnóstico e tratamento para esses tipos de câncer (INCA, 2022).

A escolha do tratamento individualizado, adequado para cada paciente é determinada por vários fatores, como o tipo de neoplasia, o estágio do câncer no momento do diagnóstico, o potencial de crescimento das células tumorais, a resposta à terapia inicial e de manutenção, o potencial de recidiva, o potencial metastático e a precisão do tratamento. Essas terapias podem abranger quimioterapia, radioterapia, terapia-alvo, imunoterapia, células CAR-T e transplante de células-tronco hematopoiéticas, incluindo abordagens combinadas quando necessário (Lichtman, 2008; Ghosh *et al.*, 2019).

Complementando as abordagens convencionais, as terapias alternativas têm despertado interesse crescente no tratamento de neoplasias hematológicas. Um exemplo notável é o uso de medicamentos derivados de plantas, como a Vincristina e a Vimbastina, extraídas da planta *Catharanthus roseus*. Esses quimioterápicos são amplamente utilizados no tratamento de leucemias e linfomas demonstrando eficácia no combate às células neoplásicas (Galindo-Solís e Fernández, 2022). A fitoterapia, com suas raízes na medicina popular, continua a ser alvo de estudo e pesquisa para explorar seu potencial no enfrentamento dessas doenças hematológicas. A integração dessas terapias alternativas com o tratamento

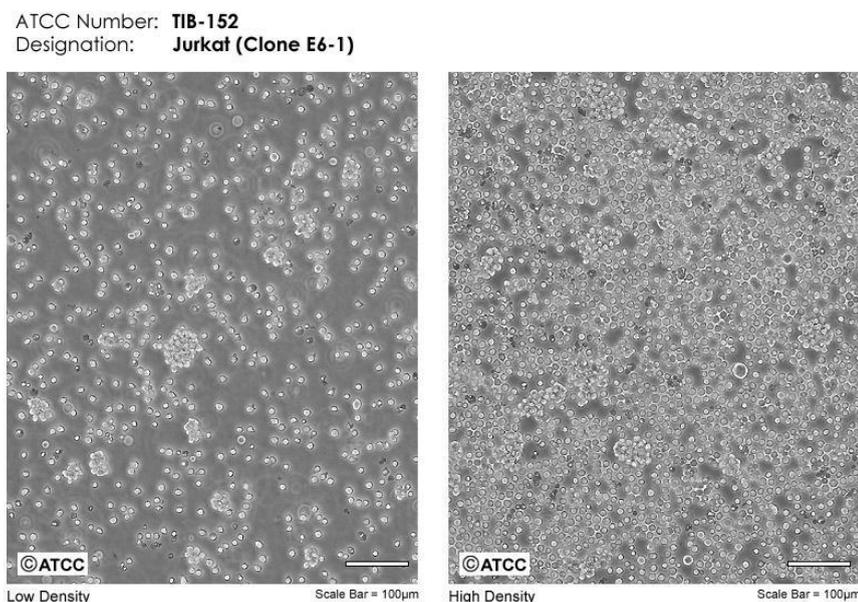
convencional pode oferecer novas perspectivas e opções para os pacientes (Cassileth *et al.*, 2003).

2.2.1 Células Jurkat

As culturas celulares existem há quase um século e, embora fossem consideradas uma metodologia relativamente simples, geraram resultados bastante significativos (Drexler e Minowada, 1998). Em 1951, na Universidade Johns Hopkins, nos EUA, George Gey e sua equipe estabeleceram a primeira linhagem celular humana imortalizada, chamada HeLa, a partir de células do tumor de Henrietta Lacks. Desde então, a linhagem HeLa tem sido utilizada em uma ampla gama de estudos, incluindo pesquisas sobre câncer, virologia e genética. A capacidade dessas células de se dividir indefinidamente permitiu aos cientistas realizar experimentos em larga escala e desenvolver novos tratamentos e vacinas, impactando na pesquisa científica e na melhoria da saúde humana (Lucey *et al.*, 2009).

Seguindo o legado da HeLa, outras linhagens celulares humanas imortalizadas também desempenharam um papel importante em diversas áreas da ciência. Um exemplo notável é a linhagem Jurkat, derivada de uma leucemia linfoblástica de células T, que se tornou crucial na pesquisa da área da imunologia. Estabelecida na década de 1970, a linhagem Jurkat permitiu o aprofundamento do estudo da ativação das células T e sua resposta a infecções, como no caso do HIV (Abraham *et al.*, 2004) (Figura 3). Essas células possibilitaram a descoberta de mecanismos de sinalização intracelular e a identificação de moléculas essenciais para o entendimento da infecção viral, como os receptores CD4 e os co-receptores CXCR4 e CCR5, que desempenham papéis fundamentais na entrada do HIV nas células hospedeiras. Assim como a linhagem HeLa, a Jurkat também impulsionou o desenvolvimento de novos tratamentos (Montano *et al.*, 2014).

Figura 3 - Aspectos microscópicos das células Jurkat.



Fonte: ATCC (<https://www.atcc.org/products/tib-152>)

2.3. TRATAMENTO FITOTERÁPICO

A fitoterapia é uma prática terapêutica que utiliza plantas medicinais e seus extratos no tratamento, prevenção e cura de diversas condições, uma tradição antiga que permanece em uso até os dias atuais. Os fitoterápicos, produzidos a partir de plantas e extratos concentrados que preservam seus compostos naturais, podem ser preparados tanto em farmácias de manipulação quanto em indústrias farmacêuticas (Maciel *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2022). Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial utiliza plantas medicinais para suprir suas necessidades de saúde na Atenção Primária (OMS, 1998).

Além de oferecer uma alternativa segura e acessível, a fitoterapia apresenta vantagens significativas em relação aos medicamentos sintéticos tradicionais, como a redução de efeitos colaterais e o menor custo de tratamento, o que a torna uma opção viável para populações de baixa renda e para sistemas de saúde pública, como o Sistema Único de Saúde (SUS) (Santos *et al.*, 2011; Zimmermann- Klemm *et al.*, 2022).

No Brasil, a fitoterapia começou a receber maior atenção no SUS a partir dos anos 2000. Em 2006, foi instituída a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, e, em 2009, surgiu o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O objetivo dessas medidas é garantir o uso seguro e racional das plantas medicinais, além de fomentar pesquisas

científicas para avaliar sua eficácia e segurança. Em 2010, o Ministério da Saúde também implementou a Farmácia Viva no SUS, que tem como finalidade integrar a fitoterapia aos serviços de saúde pública. Através dessa iniciativa, medicamentos fitoterápicos passaram a ser disponibilizados gratuitamente nas unidades básicas de saúde, e profissionais de saúde foram capacitados para orientar a população sobre o uso adequado dessas plantas (Santos *et al.*, 2011).

Metabólitos secundários de plantas, como flavonoides, saponinas e alcaloides, são os principais responsáveis pelos efeitos terapêuticos na saúde humana, oferecendo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antineoplásicas. Além disso, esses compostos desempenham um papel fundamental na defesa da planta, protegendo-a de predadores, patógenos e estresses ambientais (Cunha *et al.*, 2016). Dentre as plantas medicinais estudadas, o *Pelargonium sidoides* se destaca pelo seu extrato EPs[®] 7630, que tem ganhado notoriedade por suas propriedades imunomoduladoras.

2.2.3 EPs[®] 7630

Pelargonium sidoides, uma planta nativa da África do Sul pertencente à família *Geraniaceae*, tem sido tradicionalmente usada na medicina devido às suas propriedades terapêuticas em distúrbios gastrointestinais e infecções do trato respiratório (Brendler e Van Wyk, 2008). O EPs[®] 7630, um extrato etanólico patenteado derivado das raízes de *Pelargonium sidoides*, foi desenvolvido por Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG. em Karlsruhe, Alemanha (Figura 4). O extrato é resultado de décadas de pesquisa e desenvolvimento e sua composição exclusiva e processo de extração garantem a preservação dos compostos bioativos responsáveis por suas atividades terapêuticas (Papies *et al.*, 2021).

Figura 4 - *Pelargonium sidoides* e EPs[®] 7630.



Fonte: Compilação do autor. (A) Medicamento fitoterápico Kaloba (EP[®] 7630) pela empresa Herbarium em forma de conta gotas e cápsulas; (B) Parte aérea de *Pelargonium sidoides*; (C) Raízes de *Pelargonium sidoides* via Google Imagens.

O extrato contém uma variedade de compostos, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, ácido gálico e cumarinas (Moyo *et al.*, 2014). Entre as cumarinas, *umckalin* (7-hidroxi-5,6-dimetoxicumarina), foi encontrada apenas nessa espécie até então relatada pela literatura (Kayser e Kolodziej, 1995; Franco *et al.*, 2010). Essa cumarina parece estar relacionada com as propriedades imunomoduladoras e antibacterianas, como a indução de óxido nítrico por macrófagos murinos infectados com *Leishmania* e inibição do crescimento da bactéria *Mycobacterium smegmatis* (Mativandlela *et al.*, 2007; Thäle *et al.*, 2011).

Um estudo demonstrou que o EPs[®] 7630 influenciou o sistema imunológico inato ao promover a proliferação das células NK, conforme observado em PBMCs de indivíduos saudáveis (Polisello *et al.*, 2022). Essa descoberta complementa os achados anteriores de um resumo apresentado no *43rd Spring Meeting of the German Society of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology*, que mostraram que o extrato aquoso-etanólico de raízes de *Pelargonium sidoides* estimulou a síntese de interferon- β e a atividade das células NK (Koch *et al.*, 2002).

Pesquisas mostraram que o EPs[®] 7630 estimula a liberação de óxido nítrico (NO), juntamente com a expressão de diferentes citocinas, como a IL-22 (Thäle *et al.*, 2011; Witte *et*

al., 2015; Witte *et al.*, 2020). Além disso, em pacientes com rinossinusite bacteriana aguda, o extrato demonstrou aumentar os níveis das quimiocinas, CXCL10 e CCL2, sugerindo efeitos imunomoduladores específicos durante infecções respiratórias agudas (Perić *et al.*, 2021). Esses achados indicam o potencial do EPs® 7630, que pode ser importante na eliminação de células tumorais hematológicas por meio do fortalecimento da resposta dos linfócitos citotóxicos.

No contexto das neoplasias hematológicas, o potencial do EPs® 7630 como um agente que fortalece o sistema imune pode ser especialmente relevante. A influência positiva desse extrato na resposta imune do organismo pode ser crucial no suporte ao tratamento dessas condições, promovendo um ambiente mais favorável para os tratamentos convencionais. Contudo, apesar do grande interesse por parte dos pesquisadores pelas propriedades de *P. sidoides*, ainda existem lacunas no conhecimento quanto às vias de atuação do seu extrato em células do sistema imune que precisam ser esclarecidas.

3. HIPÓTESE

Pelargonium sidoides tem a capacidade de aumentar a atividade citotóxica de linfócitos citotóxicos a fim de eliminar células leucêmicas.

3.1. JUSTIFICATIVA

Conhecendo a importância do papel dos linfócitos citotóxicos na defesa contra células tumorais, mas reconhecendo que em alguns casos a resposta imune mediada por essas células não consegue ser eficiente, seja por um estado de exaustão ou anergia, torna-se relevante estudar estratégias que visem restaurar sua capacidade funcional nessas situações.

Os estudos sobre o potencial citotóxico e antineoplásico dos linfócitos tratados com *P. sidoides* frente às células neoplásicas hematológicas são escassos na literatura. Nesse sentido, a realização de novas pesquisas torna-se necessária para esclarecer os mecanismos de ação do EPs[®] 7630.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Analisar o efeito de *Pelargonium sidoides* (extrato EPs[®] 7630) sobre a capacidade de linfócitos citotóxicos eliminar *in vitro* células Jurkat.

4.2. ESPECÍFICOS

- Realizar o *screening* fitoquímico do extrato comercial etanólico EPs[®] 7630;
- Determinar o IC₅₀ (concentração inibitória) do EPs[®] 7630 sobre células de linhagem tumoral Jurkat e PBMCs;
- Analisar a capacidade de linfócitos citotóxicos tratados com EPs[®] 7630 induzir a morte de células de linhagem tumoral hematológica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo transversal analítico e de caráter biológico, com abordagem quantitativa do tipo experimental. Foram incluídos no estudo 8 indivíduos saudáveis, sendo 4 homens e 4 mulheres, com idades entre 25 e 40 anos, sem histórico de neoplasias, doenças autoimunes e doenças infecciosas crônicas ou ativas no momento da inclusão do estudo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (sob o protocolo CAAE:70374623.9.00008667). Após a aplicação e aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram coletados 15 mL de sangue de cada participante do projeto, por meio de punção venosa, em tubo contendo heparina. Foi analisada a capacidade citolítica dos linfócitos citotóxicos tratados com extrato de *P. sidoides*. Este estudo contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por meio do edital Demanda Universal 001/2023, processo APQ-03061-23.

5.2. SCREENING FITOQUÍMICO

Foi realizada a análise qualitativa de cumarinas, alcaloides e taninos, fenol total, flavonol, flavonas e flavanonas em extrato etanólico comercial das raízes de *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630) obtida comercialmente de Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG. (Karlsruhe, Alemanha) – importado e distribuído pela Herbarium Laboratório Botânico Ltda. As concentrações utilizadas foram: 825mg/mL (puro), 1mg/mL e 100µg/mL do extrato. Os testes realizados foram de natureza qualitativa com objetivo de determinar a presença ou ausência do metabólito secundário específico. Os testes foram conduzidos em triplicata biológica e duplicata experimental, no Laboratório de Estudos Farmacológicos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

5.2.1 Identificação da presença de cumarinas

Para a análise de detecção de cumarina sob luz ultravioleta, foi realizada por meio da reação entre solução alcoólica de hidróxido de potássio e o fitoterápico. E foram utilizadas duas amostras, extrato etanólico de Kaloba[®] (EPs[®] 7630 - *Pelargonium sidoides*) e Venalot[®] (Takeda Pharma Ltda., Jaguariúna – SP). O medicamento Venalot[®], foi utilizado como controle positivo, uma vez que continha cumarina em sua formulação. As amostras foram expostas à luz ultravioleta (365 nm), para observação de fluorescência azul ou verde e a fluorescência emitida foi observada como um indicativo da presença de cumarina. A amostra

contendo o extrato vegetal, foi analisada sob as mesmas condições para avaliar se havia a presença de compostos com propriedades fluorescentes similares aos dos controles (Matos, 1997).

5.2.2 Identificação da presença de alcaloides

De acordo com o método descrito por Costa (2002), que utiliza os reagentes de Mayer, Bertrand, Dragendorf e Wagner e promove a formação de precipitados quando há alcaloides nas amostras. O Buscopan[®], (Boehringer Ingelheim do Brasil Quím. e Farm. Ltda., Itapeverica da Serra – SP) que possui na sua composição a escopolamina (alcaloide), foi utilizado como controle positivo da reação.

5.2.3 Identificação da presença de taninos

A quantificação dos taninos presentes no extrato foi verificada pelo teste de Braymer. Essa técnica é realizada utilizando dois métodos distintos, cada um voltado para a detecção e identificação de taninos específicos, como os condensados e hidrolisáveis. O método utilizado para a detecção de taninos condensados e/ou hidrolisáveis seguiu a metodologia de Matos (1997), que descreve a preparação de uma solução de cloreto férrico a 10% em metanol. Segundo esse procedimento, os taninos hidrolisáveis adquirem uma coloração azul, enquanto os taninos condensados desenvolvem uma tonalidade verde. Para a identificação de taninos hidrolisáveis, foi empregada a metodologia recomendada pela Sociedade Brasileira de Farmacognosia em 2009. Nesse procedimento, o extrato foi misturado a uma solução contendo ácido acético a 10% e uma solução de acetato de chumbo também a 10%.

5.2.4 Identificação da presença de fenol total

A análise qualitativa de fenois totais foi verificada através de técnica colorimétrica que emprega o reagente de Folin-Ciocalteu, que forma um produto de coloração azulada quando compostos fenólicos estão presentes (Roesler *et al.*, 2007). O teste foi acompanhado de substância padrão controle (ácido gálico).

5.2.5 Identificação da presença de flavonóis, flavonas e flavanonas

A presença de flavonoides no fitoterápico foi verificada através de métodos colorimétricos que utilizam os reagentes cloreto de alumínio e 2,4-dinitrofenilhidrazina para identificação de flavonóis/flavonas e flavanonas, respectivamente, formando um produto

colorido. A quercetina (flavonol/flavona) e naringina (flavanona) foram utilizadas como controle positivo reacional (Chang *et al.*, 2002).

5.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E CULTIVO DAS CÉLULAS DE LINHAGENS TUMORAIS

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) as amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo heparina por venopunção.

As PBMCs de indivíduos saudáveis foram separadas a partir do sangue periférico por meio do gradiente de densidade Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), conforme recomendações do fabricante. Células da linhagem tumoral, Jurkat (ATCC TIB-152) - leucemia linfoblástica de células T, foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, Grand Island, NY, Estados Unidos), L-glutamina 2mM/mL (Life Technologies, Grand Island, NY, Estados Unidos), 100 U/mL de penicilina e estreptomicina (Life Technologies, Grand Island, NY, Estados Unidos). As células foram mantidas em uma incubadora úmida com atmosfera de CO₂ a 5% e 37°C.

5.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

O IC₅₀ (concentração inibitória 50%) é definido como a concentração de uma substância necessária para reduzir pela metade a viabilidade de uma população celular. No presente estudo, a avaliação do IC₅₀ foi realizada para determinar se o extrato EPs® 7630 apresenta toxicidade significativa em células normais (PBMCs) ou tumorais (Jurkat), assegurando que os efeitos imunomoduladores observados nos experimentos subsequentes não sejam atribuídos à morte celular direta induzida pelo fitoterápico.

Foram semeadas aproximadamente 1×10^5 PBMCs de indivíduos saudáveis e células da linhagem tumoral Jurkat por poço, em placas de cultura de 96 poços, para a avaliação do IC₅₀ do extrato EPs® 7630. O experimento foi realizado em quadruplicatas biológicas e duplicata experimental. Foram avaliadas as concentrações do extrato EPs® 7630: 40, 400, 4.000, 40.000 e 400.000 µg/mL. As células foram mantidas em incubadora com atmosfera 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas.

A quantificação da morte celular foi realizada por citometria de fluxo com a marcação de 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (Carlsbad, CA, Estados Unidos), marcador de morte

celular, por 15 minutos, no escuro, para identificar o total de células mortas. A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e foram registrados 50.000 eventos para a quantificação do marcador. Os dados foram analisados no software FlowJo[®] 10.8.1 (Becton Dickinson) e os percentuais de células mortas foram planilhados no programa Microsoft Excel[®] (Microsoft Corp., Redmond, WA, Estados Unidos) para posterior análise.

5.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORICIDA DE LINFÓCITOS CITOTÓXICOS TRATADOS COM EPs[®] 7630

A avaliação efeito do EPs[®] 7630 sobre o potencial tumoricida de PBMCs contra células Jurkat foi realizada em diferentes tempos e concentrações do medicamento.

Em um primeiro momento, PBMCs de indivíduos saudáveis, previamente isoladas por gradiente de densidade, foram tratadas com EPs[®] 7630, nas concentrações 10, 50 e 100µg/mL. As células foram semeadas em placas de 96 poços e cultivadas em incubadora CO₂ a 37°C por 24 horas. Após esse período, as PBMCs foram lavadas com meio RPMI e então foram colocadas em co-cultura com células Jurkat, na proporção 10:1, por 4 horas.

Em uma segunda análise, PBMCs isolados de indivíduos saudáveis foram colocados em co-cultura com células Jurkat (na proporção 10:1), com tratamento com EPs[®] 7630 (concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL) e sob estímulo de 1000U de IL-2 (Thermo Fisher Scientific, Cranbury, NJ, Estados Unidos). Adicionalmente, foram combinados os tratamentos IL-2 (1000U) + 50µg/mL e IL-2 (1000U) + 100µg/mL do extrato neste ensaio.

Por fim, PBMCs foram colocados em co-cultura com células Jurkat, em duas diferentes proporções (10:1 e 30:1), com e sem tratamento com EPs[®] 7630, na concentração de 50µg/mL, por 6 horas.

Todos os testes foram realizados em triplicatas biológicas e as amostras em co-cultura foram mantidas em incubadora úmida com atmosfera 5% de CO₂ a 37°C. A quantificação da morte das células tumorais foi realizada por citometria de fluxo com a marcação de 7-AAD nas células mortas. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e foram registrados 10.000 eventos para a quantificação dos marcadores. Os dados foram analisados no software FACSDiva[™] v6.1.3 (Becton Dickinson).

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os grupos foi realizada por meio do software GraphPad Prism[®] 9.0.0. A concentração inibitória (IC₅₀) foi determinada por regressão não linear. Os dados

relacionados à citotoxicidade foram inicialmente submetidos a uma análise estatística descritiva para calcular medidas de tendência central e de dispersão. Em seguida, foram aplicados os testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Após verificar a distribuição normal dos dados, utilizou-se o teste t pareado, para comparação de dois grupos, ou ANOVA de medidas repetidas para comparação de três ou mais grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

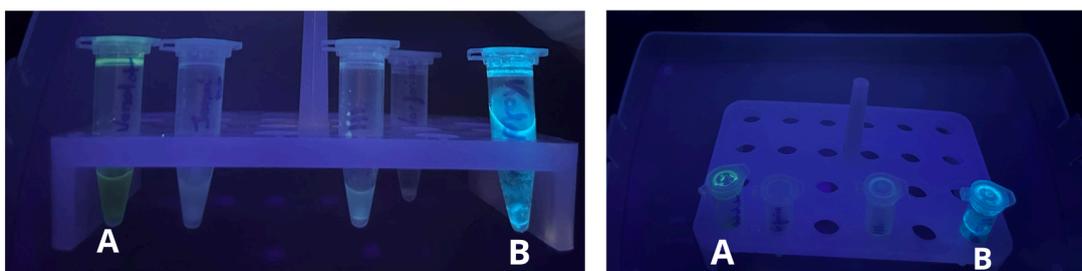
6. RESULTADOS

6.1. SCREENING FITOQUÍMICO

6.1.2. Análise qualitativa de cumarinas, alcaloides, taninos, fenol total, flavonol, flavona e flavanona

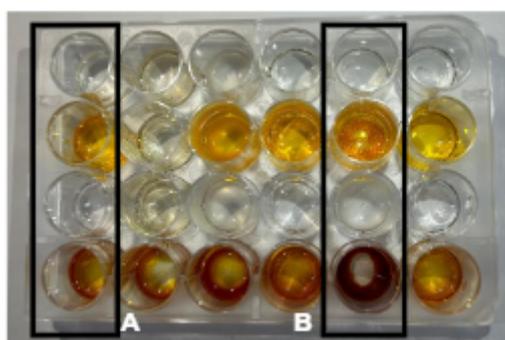
Os testes realizados de forma qualitativa revelaram a presença dos metabólitos secundários no extrato alcoólico comercial de EPs[®] 7630. Os resultados do *screening* fitoquímico indicaram a presença de cumarinas, fenois totais, flavonóis, flavonas e flavanonas e a ausência de alcaloides e taninos, pelos métodos utilizados (Figura 5).

Figura 5 - Determinação qualitativa de cumarinas em extrato alcoólico comercial de EPs[®] 7630, pelo método de hidróxido de potássio e luz UV.



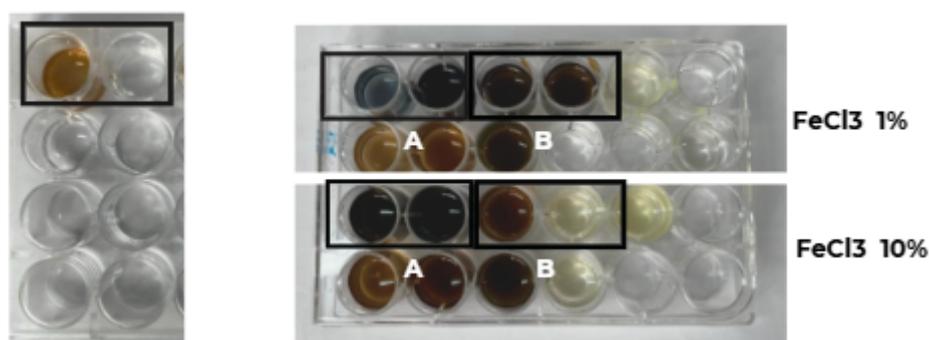
Controle positivo Venalot[®] (A) e extrato EPs[®] 7630 (B).

Figura 6 - Determinação qualitativa de alcaloide em extrato alcoólico comercial de EPs[®] 7630, pelos métodos de Mayer, Bertrand, Dragendorff e Wagner.



A formação de precipitado indica resultado positivo para o controle (*Buscopan*®), enquanto o EPs® 7630 apresentou resultado negativo. EPs® 7630 (A) e *Buscopan*® (B).

Figuras 7 e 8 - Determinação qualitativa de taninos em extrato alcoólico comercial de EPs® 7630, pelo teste de Braymer.



EPs® 7630 apresentou resultado negativo para taninos em ambos os experimentos. No Experimento 1, a amostra de EPs® 7630 não exibiu uma coloração esbranquiçada, indicando ausência de taninos. No Experimento 2, a amostra A (controle, ácido gálico/ácido tânico) apresentou coloração azul esverdeado, confirmando resultado positivo para taninos, enquanto a amostra B (EPs® 7630) não exibiu mudanças de coloração, confirmando resultado negativo.

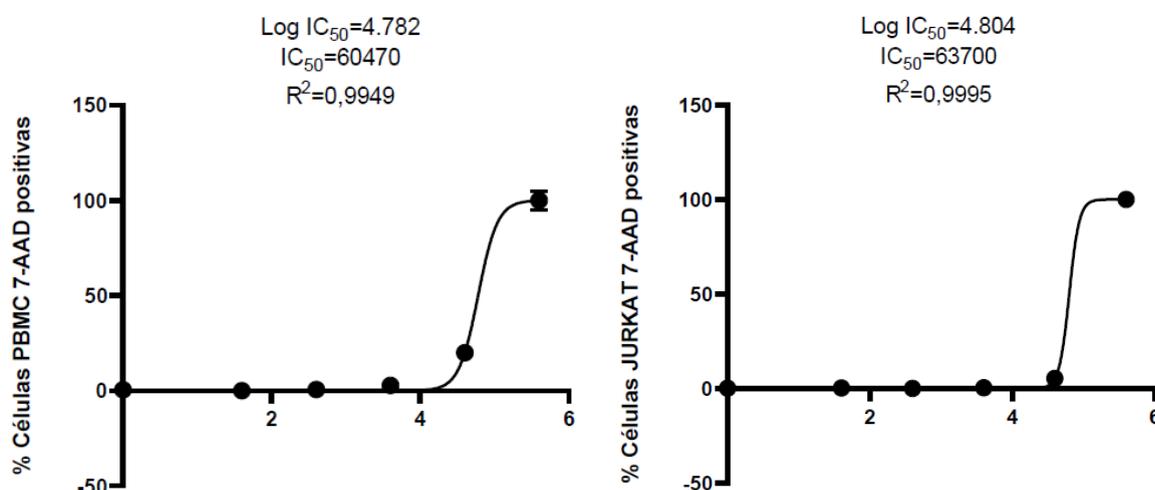
Tabela 1. Determinação qualitativa de cumarinas, alcaloides, taninos, fenois, flavonol, flavonas e flavanonas em extrato comercial etanólico EPs® 7630

Testes	Técnica utilizada	Resultado
Cumarinas	Luz UV e hidróxido de potássio	Positivo
Alcaloides	Mayer, Bertrand, Dragendorf e Wagner	Negativo
Taninos	Teste de Braymer	Negativo
Fenois totais	Folin-Ciocalteu	Positivo
Flavonois e Flavonas	Quercetina	Positivo
Flavanonas	Narigin	Positivo

6.2. CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *PELARGONIUM SIDOIDES* (EPs[®] 7630) EM PBMCs E CÉLULAS JURKAT

Os valores de IC₅₀ do extrato EPs[®] 7630 em PBMCs e células Jurkat foram obtidos por meio da detecção de células marcadas com 7-AAD por citometria de fluxo. As PBMCs apresentaram um IC₅₀ de 60.470 µg/mL (R² = 0,9949) e na linhagem tumoral Jurkat, o IC₅₀ foi de 63.700 µg/mL (R² = 0,9995) (Figura 6).

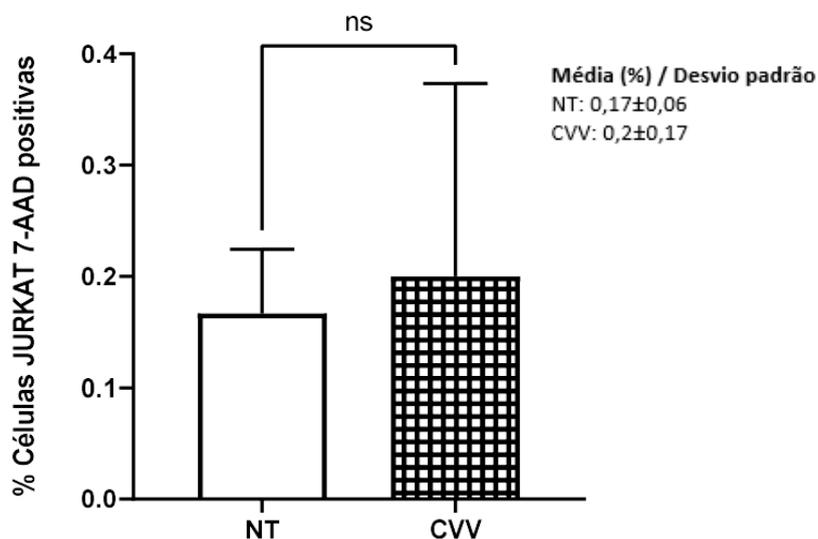
Figura 9 - Índice de citotoxicidade do extrato etanólico EPs[®] 7630 (*Pelargonium sidoides*) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e em células de linhagem Jurkat.



7-AAD: 7-amino-actinomicina D (marcador de morte celular).

Durante a execução deste experimento, foi realizada a análise de indução de morte com solução contendo etanol e glicerol, como controle veículo, na proporção correspondente à concentração de 4.000 µg/mL de EPs[®] 7630. Este tratamento não promoveu morte substancial de células Jurkat. Comparando os índices de morte induzida pelo controle veículo e aqueles em células não tratadas, não foi observada diferença significativa (médias 0,17% vs. 0,20%, $p = 0,7418$) (Figura 7).

Figura 10 - Comparação da capacidade de indução de morte pelo controle veículo do extrato etanólico EPs[®] 7630 (*Pelargonium sidoides*) em células de linhagem Jurkat e em células não tratadas

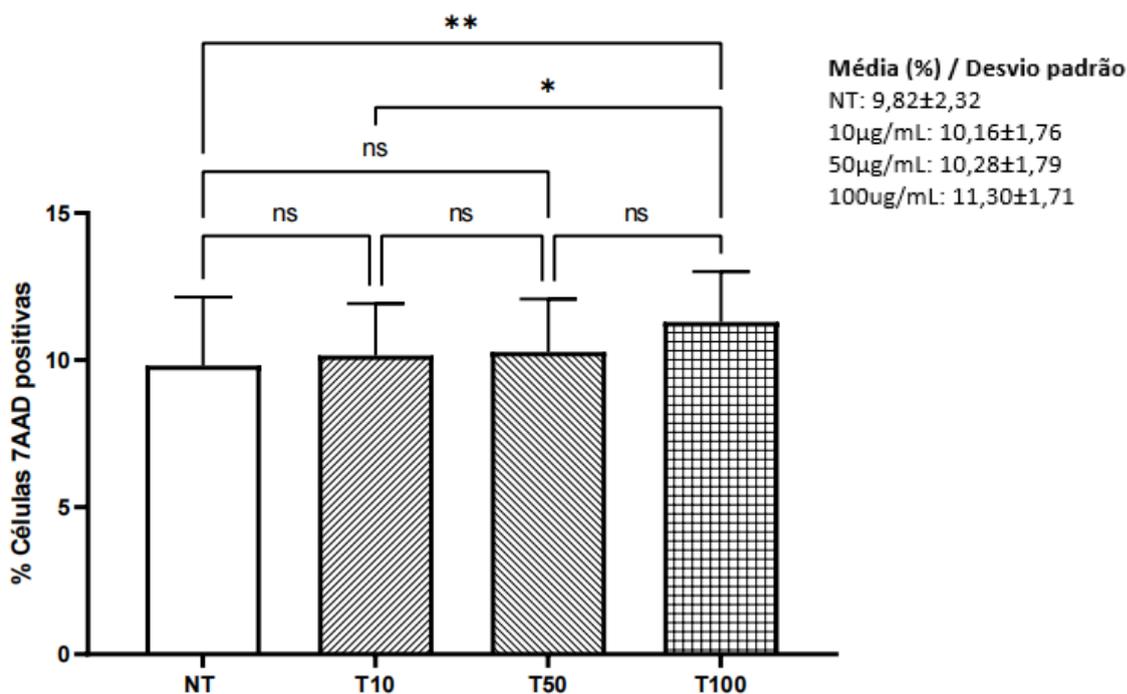


NT: não tratado; CVV: controle veículo. 7-AAD: 7-amino-actinomicina D (marcador de morte celular). Teste t pareado: $p=0,7418$.

6.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CITOLÍTICA DE LINFÓCITOS CITOTÓXICOS TRATADOS COM EPs[®] 7630

Quanto à capacidade de eliminação de células tumorais pelos linfócitos citotóxicos, os resultados do teste de ANOVA de medidas repetidas indicaram que, no experimento em que PBMCs tratados por 24 horas com EPs[®] 7630, houve maior percentual de morte de células Jurkat pelas células tratadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comparado às células não tratadas (NT) ($p = 0,0094$) e àquelas tratadas com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,0001$) (Figura 8).

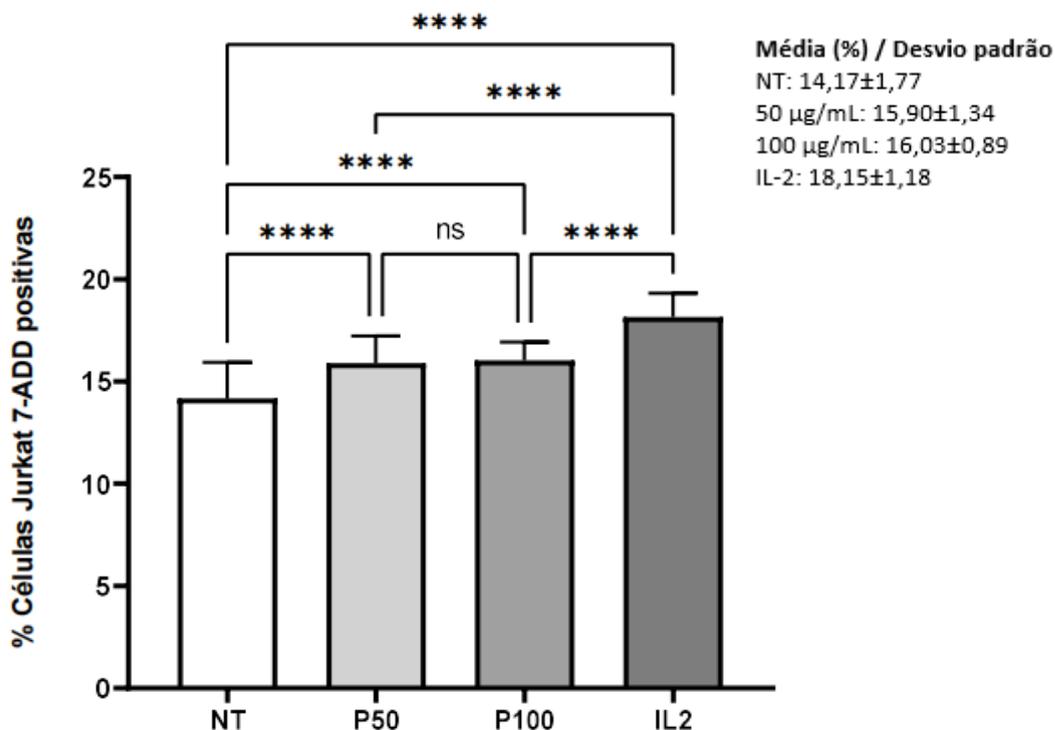
Figura 11 - Efeito do extrato EPs[®] 7630 em linfócitos citotóxicos tratados por 24 horas sobre a indução de morte em células de linhagem Jurkat



NT: não tratado; P10: tratamento com 10 µg/mL de EPs[®] 7630; P50: tratamento com 50 µg/mL de EPs[®] 7630; P100: tratamento com 100 µg/mL de EPs[®] 7630; 7-AAD: 7-amino-actinomicina D (marcador de morte celular); ANOVA de medidas repetidas: $F=6,07$; $p=0,0094$.

Quando as PBMCs de indivíduos saudáveis foram mantidas em co-cultura com células Jurkat por 4 horas em tratamento com EPs[®] 7630 (na proporção 10:1), observou-se que o tratamento nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL promoveu maior morte de células Jurkat em relação ao grupo não tratado ($p<0,0001$ para ambas as análises). O estímulo com IL-2 induziu um maior percentual de morte de células tumorais comparado a todas as demais condições ($p<0,0001$ para todas as comparações). Não houve diferença de indução de morte celular entre os tratamentos com 50 µg/mL e 100 µg/mL do extrato ($p = 0,9615$) (Figura 9).

Figura 12 - Efeito do extrato EPs[®] 7630 em linfócitos citotóxicos sobre a indução de morte em células de linhagem Jurkat em co-cultura por 4 horas

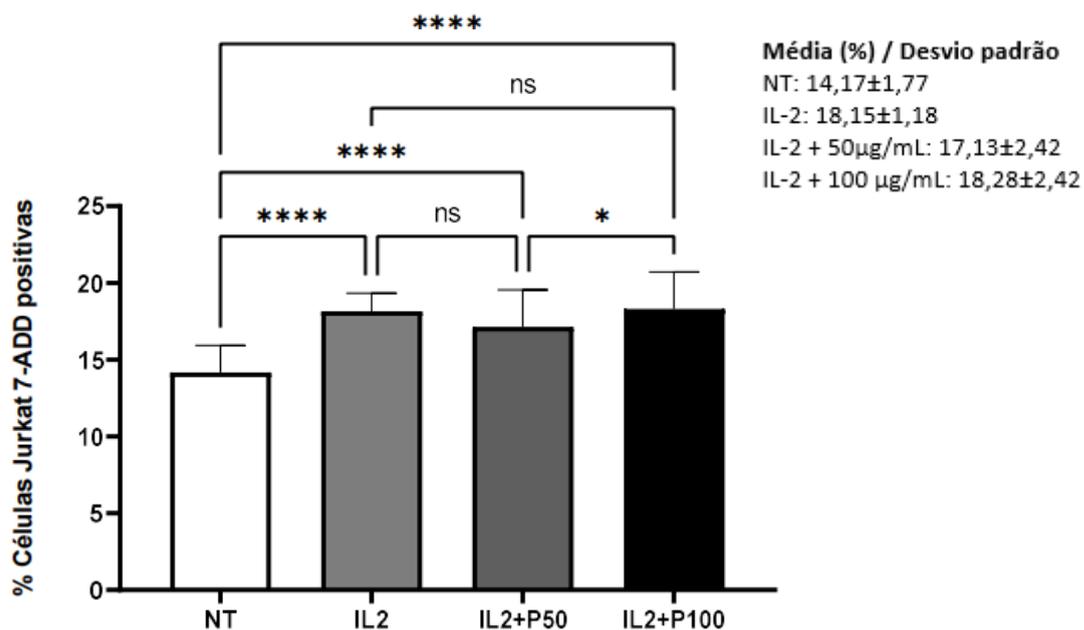


NT: não tratado; P50: tratamento com 50 µg/mL de EPs[®] 7630; P100: tratamento com 100 µg/mL de EPs[®] 7630; IL2: interleucina 2; 7-AAD: 7-amino-actinomicina D (marcador de morte celular); ANOVA de medidas repetidas: $F=70,92$; $p<0,0001$.

Adicionalmente, foi avaliada a combinação dos tratamentos IL-2 (1000 U) + 50 µg/mL e IL-2 (1000 U) + 100 µg/mL do extrato. Os resultados mostraram que PBMCs que não receberam tratamento promoveram menor percentual de morte de células Jurkat tanto comparado à associação IL-2 + 50 µg/mL ($p<0,0001$), quanto a IL-2 + 100 µg/mL ($p<0,0001$).

Não foi observada diferença significativa ao comparar o tratamento isolado com IL-2 com as combinações com 50 e 100 µg/mL de EPs[®] 7630 ($p = 0,0824$ e $p = 0,9882$, respectivamente). No entanto, as análises indicaram uma maior indução de morte de células tumorais no tratamento IL-2 + 100 µg/mL comparado ao IL-2 + 50 µg/mL ($p = 0,0403$) (Figura 10).

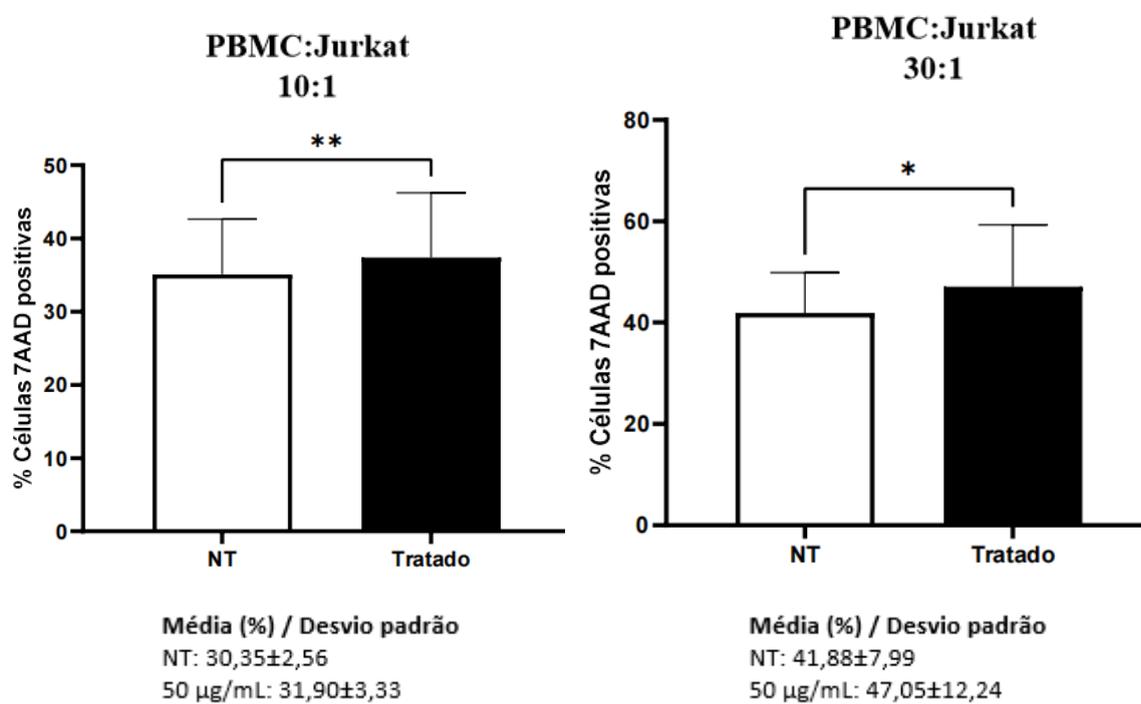
Figura 13 - Efeito do extrato EPs^{\circledR} 7630 em linfócitos citotóxicos sobre a indução de morte em células de linhagem Jurkat em co-cultura por 4 horas, sob estímulo de interleucina 2 (IL-2).



NT: não tratado; P50: tratamento com 50 µg/mL de EPs^{\circledR} 7630; P100: tratamento com 100 µg/mL de EPs^{\circledR} 7630; 7-AAD: 7-amino-actinomicina D (marcador de morte celular); ANOVA de medidas repetidas: $F=70,92$; $p<0,0001$.

Já em relação às análises de diferentes proporções de PBMCs e células Jurkat mantidas em co-cultura por 6 horas, observou-se que houve maior percentual de morte de células Jurkat naquelas tratadas com EPs^{\circledR} 7630 tanto na proporção 10:1 ($p = 0,0043$), quanto 30:1 ($p = 0,0357$) (Figura 11).

Figura 14 - Efeito do extrato EPs[®] 7630 em linfócitos citotóxicos sobre a indução de morte em células de linhagem Jurkat em co-cultura por 6 horas



NT: não tratado; Tratado: 50 µg/mL de EPs[®] 7630; 7-AAD: 7-amino-actinomicina D (marcador de morte celular); Teste t pareado: p=0,0043 e p=0,0357, para 10:1 e 30:1, respectivamente.

7. DISCUSSÃO

Este estudo investigou o potencial de indução de atividade citotóxica de linfócitos tratados com o extrato EPs[®] 7630 na eliminação de células de neoplasias hematológicas. Este composto, proveniente da planta *Pelargonium sidoides*, tem sido usado tradicionalmente por suas propriedades medicinais, embora os mecanismos responsáveis pelo seu potencial terapêutico ainda não sejam completamente compreendidos (Kolodziej *et al.*, 2003; Seidel e Taylor, 2004).

A análise fitoquímica do composto aqui avaliado demonstrou a presença de metabólitos secundários, incluindo cumarinas, fenois totais, flavonóis, flavonas e flavanonas. Esses compostos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Kolodziej *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2016). Não foram detectados alcaloides e taninos, de acordo com os métodos empregados.

Estudos prévios identificaram uma variedade de metabólitos secundários no extrato de *P. sidoides*, incluindo flavonoides, taninos, fenois e ácidos gálicos (Kolodziej *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2011). Utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, foram identificados no extrato comercial EPs[®] 7630, vinte e dois compostos fenólicos, incluindo derivados de hidroxí, metoxi e cumarinas sulfatadas, flavonóis e entre outros. Além disso, foi identificado a cumarina *umckalin*, o que confirma que o extrato foi preparado a partir das raízes da planta de *Pelargonium sidoides* (Pereira *et al.*, 2016). Segundo a bula da Kaloba[®], fornecida pela empresa Herbarium Laboratório Botânico Ltda., cada 21 gotas de EPs[®] 7630 possui uma concentração de fenois totais entre 0,08% a 0,32% expressos em epicatequina (flavonol). A presença desses metabólitos pode auxiliar na compreensão dos possíveis mecanismos de ação do extrato e sua influência na resposta imune do organismo.

A avaliação do IC₅₀ de EPs[®] 7630 revelou valores aproximados de 60 mg/mL, tanto em células de indivíduos saudáveis quanto em células Jurkat. A alta tolerância e baixa toxicidade do extrato de *P. sidoides* são vantajosas quando se trata de um agente imunomodulador, sugerindo que pode influenciar o sistema imunológico sem causar danos significativos às células saudáveis (Kolodziej *et al.*, 2007).

Conforme discutido por Theisen e Muller (2012), o extrato EPs[®] 7630 demonstrou alta tolerância em estudos com camundongos, sem evidenciar efeitos tóxicos observáveis. Esses achados demonstram a segurança, também relatada em ensaios clínicos com adultos e crianças, documentados por vários autores (Mathys *et al.*, 2003; Matthys *et al.*, 2007; Haidvogel e Heger, 2007; Bachert *et al.*, 2009).

Considerando que muitos fitoterápicos podem causar efeitos adversos em órgãos como o fígado, pesquisadores avaliaram casos de hepatotoxicidade associada a medicamentos fitoterápicos e concluíram que o EPs[®] 7630 não estava entre os extratos relacionados a eventos adversos hepáticos. O extrato demonstrou efeitos benéficos na modulação do sistema imunológico, sem evidências de danos ao fígado, o que é crucial para garantir sua segurança em tratamentos prolongados (Teschke *et al.*, 2012).

Witte e colaboradores realizaram dois estudos sobre os efeitos do EPs[®] 7630 no sistema imunológico humano, destacando a complexidade dos efeitos desse extrato. O primeiro estudo mostrou que o extrato EPs[®] 7630 não apenas ativa os monócitos e induz citocinas pró-inflamatórias, mas também modula especificamente sua capacidade de produção de mediadores associados a uma variedade de respostas imunes. Isso inclui a geração de neutrófilos na medula óssea, além da produção de linfócitos T helper 17 (Th17) e linfócitos T helper 22 (Th22). Esses resultados destacam a ampla gama de efeitos imunológicos do extrato e sua capacidade de modular diferentes aspectos da resposta imune (Witte *et al.*, 2015). O estudo mais recente do grupo concentrou-se no potencial do EPs[®] 7630 em fortalecer a defesa antimicrobiana das vias aéreas. E observaram que o extrato foi capaz de induzir seletivamente a produção de IL-22 e IL-17, citocinas essenciais na defesa contra infecções bacterianas das vias aéreas. A produção de IL-22 e IL-17 pelos linfócitos T, especialmente as células T CD4+, são essencialmente dependentes de mediadores solúveis, como IL-1 e IL-23, bem como do contato celular direto com os monócitos. No entanto, o EPs[®] 7630 limitou fortemente a capacidade de produção de IFN- γ de células linfoides inatas, sugerindo um papel na regulação do dano tecidual durante o uso do extrato para infecções das vias aéreas. Essa interação complexa entre células T e monócitos revela a importância da comunicação intercelular na modulação da resposta imune pelo extrato (Witte *et al.*, 2020).

O efeito do extrato de *P. sidoides* também foi avaliado em relação à atividade anti-HIV-1. Foi evidenciado que o extrato foi capaz de proteger tanto PBMCs quanto os macrófagos da infecção por diferentes cepas do HIV-1 (Helfer *et al.*, 2014). Esses resultados são significativos, pois destacam a eficácia do extrato tanto em células do sistema imunológico circulante quanto em células residentes nos tecidos, respectivamente.

Buscando avaliar o efeito de *P. sidoides* sobre a capacidade de linfócitos citotóxicos eliminar *in vitro* células tumorais de origem hematológica, foram realizados experimentos com diferentes concentrações do extrato, bem como variados tempos de tratamento/co-cultura. Os resultados destes ensaios revelaram que no tratamento por 24h, sem

adição do extrato na co-cultura, a concentração que promoveu maior percentual de morte de células Jurkat por PBMCs em comparação à ausência de tratamento foi a de 100 µg/mL.

Além de comparar o efeito do tratamento, buscava também compreender se o tratamento prévio permitiria a consolidação de um efeito potencializador da capacidade antitumoral de linfócitos citotóxicos. Mesmo não sendo objeto da presente pesquisa, foi possível observar que o ensaio de co-cultura realizado com a presença do extrato promoveu mais morte de células tumorais comparado ao ensaio com tratamento prévio por 24h, sem adição de EPs[®] 7630 na co-cultura, nas mesmas 4 horas de duração. Observamos, por exemplo, um maior percentual de morte de células tumorais nas amostras tratadas com o extrato. No entanto, também verificamos que células não tratadas induziram maior morte de células NK. Esses resultados nos levam a inferir que a manutenção das células em cultura por 24 horas seja a principal causa da redução da capacidade antitumoral, quando comparadas às células recém-coletadas.

No ensaio de 4 horas com tratamento concomitante, foi possível observar maior potencial tumoricida nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL, em relação à ausência de tratamento. De maneira diversa, a concentração de 50 µg/mL havia promovido aumento significativo de morte tumoral no ensaio de 24 horas. Uma das possíveis respostas para esta questão seria uma provável perda de capacidade citolítica pela a manutenção em cultura por 24 horas.

O estímulo com IL-2 induziu um maior percentual de morte de células tumorais e diante disso, optou-se por comparar o tratamento com IL-2 em combinações com 50 e 100 µg/mL de EPs[®] 7630. As análises indicaram uma maior indução de morte de células tumorais no tratamento IL-2 + 100 µg/mL comparado ao IL-2 + 50 µg/mL, o que não havia sido observado nos tratamentos isolados. O papel da atividade estimulatória de IL-2 sobre linfócitos T CD8 e células NK já é bem conhecido (Rosenberg *et al.*, 2004). Cabe avaliar, em estudos futuros, as vias de ativação imunológicas que estariam envolvidas na associação do extrato EPs[®] 7630 com a IL-2.

Em relação ao ensaio de co-cultura por 6 horas, duas horas a mais que os demais tempos utilizados, também houve mais morte de células Jurkat naquelas tratadas com EPs[®] 7630. Essa potencialização da capacidade citolítica de PBMCs pelo extrato foi observada tanto na proporção de 10 linfócitos para 1 tumoral, quanto 30:1. Em comparação à co-cultura concomitante por 4 horas, foi possível observar que o tempo adicional de co-cultura levou a uma maior mortalidade de células Jurkat, sendo quase duas vezes maior. Este dado não traz insights importantes para as análises relacionadas ao objeto da pesquisa, mas traz um melhor

entendimento sobre futuros desenhos experimentais que abarcam citotoxicidade de linfócitos citotóxicos.

Para analisar uma possível interferência do veículo do extrato comercial EPs[®] 7630 nas análises de indução de morte de células Jurkat, foi realizada a comparação entre tratamento com veículo (etanol e glicerol) e a ausência de tratamento. A concentração utilizada foi quarenta vezes maior que a concentração de veículo em 100 µg/mL do extrato, a maior concentração avaliada na presente pesquisa. Os resultados apontaram que não houve uma morte substancial de células Jurkat pelo veículo. Esse dado é importante uma vez que mostra que o veículo não interfere, tanto no IC₅₀, quanto na promoção da morte de células tumorais no ensaio de co-cultura com PBMCs.

Em relação ao estímulo com IL-2, claramente se pode perceber que esta citocina atua como um forte estimulador da resposta mediada por LTCs em eliminar células Jurkat, o que já era esperado, segundo dados da literatura (Rosenberg *et al.*, 2004). No entanto, o uso terapêutico de IL-2 em humanos têm demonstrado vários efeitos adversos. Dentre eles temos: reações cutâneas, efeitos hematológicos como trombocitopenia e leucopenia e toxicidade renal (Feldman; Zang, 1995). Atualmente, a maior parte dos compostos aprimorados à base de IL-2 está sendo desenvolvida para o tratamento do câncer, enquanto alguns estão em fase inicial de ensaios clínicos para doenças autoimunes. No momento, apenas resultados limitados de ensaios clínicos randomizados foram divulgados, o que impede uma conclusão definitiva sobre a eficácia dos compostos melhorados de IL-2 (Raeber *et al.*, 2023).

Diante dos achados da literatura, o EPs[®] 7630 se apresenta como um fitoterápico promissor para ser empregado como tratamento complementar. Um exemplo interessante desta forma de terapia é a utilização de medicamentos tais como Resveratrol (estilbenos), Vimblastina e Vincristina (vinca), Paclitaxel e Docetaxel (taxanos), utilizados no tratamento de neoplasias malignas. São derivados de plantas e têm sido objeto de estudos em associação com fitoterápicos, visando avaliar possíveis efeitos sinérgicos na inibição da divisão celular (Schneider *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2017). A associação da curcumina com Paclitaxel foi avaliada em adenocarcinoma de mama, e os resultados obtidos indicaram diminuição do crescimento tumoral em um modelo de rato em xenoinxerto (Gao *et al.*, 2019).

A sinergia entre os medicamentos e fitoterápicos pode ampliar a eficácia, diminuir a toxicidade e a resistência ao tratamento (Pereira *et al.*, 2016). Um exemplo disso é a combinação de resveratrol com clofarabina e 5-fluorouracil, que demonstrou interações sinérgicas proeminentes, resultando em efeitos inibitórios significativos no crescimento do mesotelioma maligno. Os autores do estudo também evidenciaram que a terapia adjuvante

com resveratrol inibiu a proliferação celular e foi pouco tóxica em células mesoteliais saudáveis (Lee *et al.*, 2013; Okem *et al.*, 2023).

Neste contexto, os resultados aqui apresentados sobre a potencialização da capacidade antitumoral de PBMCs pelo extrato EPs[®] 7630 de *P. sidoides*, estabelecem uma nova compreensão sobre a viabilidade da utilização do fármaco como terapia complementar às neoplasias. Uma vez que este composto apresenta baixíssima toxicidade, poderá ser empregado com vistas a estimular o sistema imunológico sem causar danos significativos às células saudáveis.

8. CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato EPs[®] 7630, obtido das raízes de *Pelargonium sidoides*, demonstrou eficácia significativa na indução de morte de células tumorais Jurkat, especialmente nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL. O estímulo com IL-2 potencializou ainda mais esse efeito, destacando-se como a condição com maior percentual de morte celular. Na co-cultura, observou-se maior citotoxicidade em células Jurkat tratadas com EPs[®] 7630 nas proporções de 10:1 e 30:1, reforçando o potencial do extrato como agente imunomodulador. Esses resultados evidenciam o impacto promissor do EPs[®] 7630 em tratamentos relacionados à modulação da resposta imune e na atividade antitumoral.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, R.T.; WEISS, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. **Nat Rev Immunol.** 4(4): p. 301-8, 2004.

ALMEIDA, J.R.C de. **Farmacêuticos em Oncologia: Uma Nova Realidade.** 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2017.

AUBERGER, P.; TAMBURINI-BONNEFOY, J.; PUISSANT, A. Drug Resistance in Hematological Malignancies. **Int J Mol Sci,** 21(17):6091, 2020.

BACHERT, C.; SCHAPOWAL, A.; FUNK, P.; KIESER, M. Treatment of acute rhinosinusitis with the preparation from *Pelargonium sidoides* EPs 7630: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Rhinology,** 2009.

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin,** 74(3):229-263, 2024.

BRENDLER, T.; VAN WYK, B.-E. A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae). **Journal of Ethnopharmacology,** 119(3), p. 420–433, 2008.

CASSILETH, B. R.; VICKERS, A. J. Complementary and alternative therapies. **Urologic Clinics of North America,** v. 30, n. 2, p. 369-376, 2003.

CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis,** [s.l.], v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

COSTA, A. F. Farmacognosia, v. 2. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 1120, 2002.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química,** v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. dos. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal,** v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

DREXLER, H.G.; MINOWADA, J. History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines. **Leuk Lymphoma,** 31(3-4), p. 305-316, 1998.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; & SCHREIBER, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. **Immunity,** 21(2), 137–148, 2004.

ESENSTEN, J.H.; HELOU, Y.A.; CHOPRA, G.; WEISS, A.; BLUESTONE, J.A. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. **Immunity**, 44(5): p. 973-988, 2016.

FANTINI, M.; ARLEN, P.M.; TSANG, K.Y. Potentiation of natural killer cells to overcome cancer resistance to NK cell-based therapy and to enhance antibody-based immunotherapy. **Front Immunol**, 2023.

FELDMAN, R. A.; ZANG, S. Toxicity of high-dose interleukin-2 therapy. **Seminars in Oncology**, v. 22, n. 1 Suppl 1, p. 23-27, 1995.

FERLAY, J.; ERVIK, M.; LAM, F.; LAVERSANNE, M.; COLOMBET, M.; MERY, L.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**, 2024.

FERREIRA, E. E.; SANTOS CARVALHO, E.; CASTRO SANT, C. A importância do uso de fitoterápicos como prática alternativa ou complementar na atenção básica: revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e44611124643, 2022.

FRANCO, L.; DE OLIVEIRA, B. H. Determination of umckalin in commercial tincture and phytopreparations containing *Pelargonium sidoides* by HPLC: comparison of sample preparation procedures. **Talanta**, 81(4-5), 1368-1372, 2010.

GALINDO-SOLÍS, J. M.; FERNÁNDEZ, F.J. Endophytic fungal terpenoids: natural role and bioactivities. **Microorganisms** 10(2):339, 2022.

GAO, J. et al. PEGylated lipid bilayer coated mesoporous silica nanoparticles co-delivery of paclitaxel and curcumin leads to increased tumor site drug accumulation and reduced tumor burden. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 140, p. 105070, 2019.

GHOSH, S.; LALANI, R.; PATEL, V.; BARDOLIWALA, D.; MAITI, K.; BANERJEE, S.; BHOWMICK, S.; MISRA, A. Combinatorial nanocarriers against drug resistance in hematological cancers: Opportunities and emerging strategies. **J Control Release**, 296:114-139, 2019.

HAIDVOGL, M.; HEGER, M. Treatment effect and safety of EPs 7630-solution in acute bronchitis in childhood: report of a multicentre observational study. **Phytomedicine**, 2007.

HATJIHARISSI, E.; XU, L.; SANTOS, D. D.; HUNTER, Z. R.; CICCARELLI, B. T.; VERSELIS, S.; MODICA, M.; CAO, Y.; MANNING, R. J.; LELEU, X.; DIMMOCK, E. A.; KORTSARIS, A.; MITSIADE, C.; ANDERSON, K. C.; FOX, E. A.; TREON, S. P. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc γ RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2561-2564, 2007

HELPER, M.; KOPPENSTEINER, H.; SCHNEIDER, M.; REBENSBURG, S.; FORCISI, S.; MÜLLER, C.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; SCHINDLER, M.; BRACK-WERNER, R. The root extract of the medicinal plant *Pelargonium sidoides* is a potent HIV-1 attachment inhibitor. **PLoS One**, v. 9, n. 1, e87487, 2014.

HOFMANN, W. K.; TRUMPP, A.; MÜLLER-TIDOW, C. Therapy resistance mechanisms in hematological malignancies. **Int J Cancer**, 152(3):340-347, 2023.

IZUEGBUNA, O.; OTUNOLA, G. A.; BRADLEY, G. GC-MS Profiling and Antineoplastic Activity of *Pelargonium Inquinans* Ait Leaves on Acute Leukaemia Cell Lines U937 and Jurkat. **Nutrition and Cancer**, 74(5), 1849–1871, 2021.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Highly oxygenated coumarins from *Pelargonium sidoides*. **Phytochemistry**, 39(5), 1181-1185, 1995.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. **Phytotherapy Research**, 15(2), p. 122–126, 2001.

KOCH, E.; LANZENDÖRFER-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®). In: 43rd Spring Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology. 2002. p. 12-14.

KOLODZIEJ, H.; KAYSER, O.; RADTKE, O. A.; KIDERLEN, A. F.; KOCH, E. Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. **Phytomedicine**, v. 10, n. 4, p. 18-24, 2003.

KOLODZIEJ, H. Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabos. **Phytomedicine**, v. 14, n. 6, p. 9-17, 2007.

KOLODZIEJ, 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**, 14, p. 18–26, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia- Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1440, 2016.

LASKOWSKI, T. J.; BIEDERSTÄDT, A.; REZVANI, K. Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 10, p. 557-575, 2022.

LEE, Y. et al. Synergistic anti-cancer effects of resveratrol and chemotherapeutic agent clofarabine against human malignant mesothelioma MSTO-211H cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 61-68, 2013.

LETTAU, M.; PAULSEN, M.; SCHMIDT, H.; JANSSEN, O. Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 6-7, p. 456-466, 2011.

LICHTMAN, M. A. Battling the Hematological Malignancies: The 200 Years' War. **The Oncologist**, v. 13, n. 2, p. 126-138, 2008.

LONG, E. O. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. **Immunological reviews**, v. 224, n. 1, p. 70-84, 2008.

LUCEY, B. P.; NELSON-REES, W. A.; HUTCHINS, G. M. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. **Arch Pathol Lab Med**, v. 133, n. 9, p. 1463–1467, 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, p. 429-438, 2002.

MATIVANDLELA, S. P. N.; MEYER, J. J. M.; HUSSEIN, A. A.; LALL, N. Antitubercular Activity of Compounds Isolated from *Pelargonium sidoides*. **Pharmaceutical Biology**, 45(8), 645–650, 2007.

MATOS, F.J. (Introdução à fitoquímica experimental. 2nd Edition, Edicoes UFC, Fortaleza, 1997.

MATTHYS, et al. Efficacy and safety of an extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) in adults with acute bronchitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Phytomedicine**, v. 14(1): p. 69-74, 2003.

MEUER, S. C.; HAUER, M.; DEUSCH, K.; MOEBIUS, U.; MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K. H. Two pathways of T cell activation. **Behring Institute Mitteilungen**, 1987.

MEYER, C.; PRIES, R.; WOLLENBERG, B. Established and novel NF- κ B inhibitors lead to downregulation of TLR3 and the proliferation and cytokine secretion in HNSCC. **Oral Oncology**, 47(9), p. 818–826, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2022.

MONTANO, M. Model systems. **Translational Biology in Medicine**, p. 9–33, 2014.

MOYO, M.; VAN STADEN, J. Medicinal properties and conservation of *Pelargonium sidoides* DC. **J Ethnopharmacol**, 152(2), 243-255, 2014.

MYERS, J. A.; MILLER, J. S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 18, n. 2, p. 85-100, 2021.

NEUGEBAUER, P.; MICKENHAGEN, A.; SIEFER, O.; WALGER, M. A new approach to pharmacological effects on ciliary beat frequency in cell cultures exemplary measurements under *Pelargonium sidoides* extract (EPs 7630). **Phytomedicine**, Velberg, v. 12, 1-2, p. 46-51, 2005.

OKEM, A.; HENSTRA, C.; LAMBERT, M.; HAYESHI, R. A review of the pharmacodynamic effect of chemo-herbal drug combinations therapy for cancer treatment. **Medicine in Drug Discovery**, v. 17, p. 100147, 2023.

OLSON, J. A.; LEVESON-GOWER, D. B.; GILL, S.; BAKER, J.; BEILHACK, A.; NEGRIN, R. S. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. **Blood**, v. 115, n. 21, p. 4293-4301, 2010.

OMS. Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (5th ed.). International Agency for Research on Cancer. Disponível em <https://doi.org/10.1007/978-3-030-86231-8>, 2022.

- PAPIES, J.; EMANUEL, J.; HEINEMANN, N.; KULIĆ, Ž.; SCHROEDER, S.; TENNER, B.; LEHNER, MD.; SEIFERT, G; MÜLLER, MA. Antiviral and Immunomodulatory Effects of *Pelargonium sidoides* DC. Root Extract EPs® 7630 in SARS-CoV-2-Infected Human Lung Cells. **Front Pharmacol**, 12:757666, 2021.
- PEREIRA, A.S.P.; BESTER, M.J.; SOUNDY, P.; APOSTOLIDES, Z. Anti-proliferative properties of commercial *Pelargonium sidoides* tincture, with cell-cycle G0/G1 arrest and apoptosis in Jurkat leukaemia cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p.1831-1840, 2016.
- PERIĆ, A.; VEZMAR KOVAČEVIĆ, S.; BARAC, A.; PERIĆ, A. V.; VOJVODIĆ, D. Effects of *Pelargonium Sidoides* Extract vs Roxithromycin on Chemokine Levels in Nasal Secretions of Patients with Uncomplicated Acute Rhinosinusitis. **Laryngoscope Invest. Otolaryngol.** 6 (1), 25–33, 2021.
- POLISELLO, A. L. F.; CARNEIRO, A. C. D. M.; TANAKA, S. C. S. V.; SILVA, M. V. da; MORAES-SOUZA, H.; VITO, F. B. The role of *Pelargonium sidoides* EPs 7630 extract in the proliferation of cytotoxic lymphocytes. **Braz. J. Dev.** 8 (10), p. 66632–66649, 2022.
- RAEBER, M. E. et al. A systematic review of interleukin-2-based immunotherapies in clinical trials for cancer and autoimmune diseases. **eBioMedicine**, v. 90, 104539, 2023.
- ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, Campinas, v.27, n.1, p. 53-60, 2007.
- ROSENBERG, S.A.; YANG, J.C.; RESTIFO, N.P. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, 4(3), 272-283, 2004.
- SANTOS, R. L.; GUIMARÃES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.
- SARASWATHY, M.; GONG, S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. **Biotechnol Adv**, v. 31, p. 1397-407, 2013.
- SEIDEL, V.; TAYLOR, P. W. In vitro activity of extracts and constituents of *Pelargonium* against rapidly growing mycobacteria. **Int J Antimicrob Agents**, Birmingham, v. 23, n. 6, p. 613-619, 2004.
- SIMONETTA, F.; ALVAREZ, M.; NEGRIN, R. S. Natural killer cells in graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 465, 2017.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. **Taninos**. 2009. Disponível em: <http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/taninos.html>. Acesso em: 11 set. 2024.
- SUN, J.; LANIER, L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. **Nat Rev Immunol**, 11, p. 645–657, 2011.
- SCHNEIDER, Y.; CHABERT, P.; STUTZMANN, J.; COELHO, D.; FOUGEROUSSE, A.; GOSSÉ, F.; LAUNAY, J. F.; BROUILLARD, R.; RAUL, F. Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. **Int J Cancer**, 107(2):189-196, 2003.
- SCHWARTZ, R. H. T CELL ANERGY. **Annual Review of Immunology**, 21(1), 305–334, 2003.

SWERDLOW, S. H. et al. WHO classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissue: **IARC**: Lyon 2017.

TESCHKE, R.; FRENZEL, C.; SCHULZE, J.; EICKHOFF, A. Spontaneous reports of primarily suspected herbal hepatotoxicity by *Pelargonium sidoides*: was causality adequately ascertained? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63:1–9, 2012.

THÄLE, C.; KIDERLEN, A. F.; KOLODZIEJ, H. Anti-infective Activities of *Pelargonium Sidoides* (EPS® 7630): Effects of Induced NO Production on *Leishmania Major* in Infected Macrophages and Antiviral Effects as Assessed in a Fibroblast-Virus protection Assay. **Planta Med.** 77 (7), 718–725, 2011.

THEISEN, L. L.; MULLER, C. P. EPs® 7630 (Umckaloabo®), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 94, n. 2, p. 147-156, 2012.

VASAN, N.; BASELGA, J.; HYMAN, D.M. A view on drug resistance in cancer, **Nature** 575, 299–309, 2019.

VERBIST, K. C.; GUY, C. S.; MILASTA, S.; LIEDMANN, S.; KAMIŃSKI, M. M.; WANG, R.; GREEN, D. R. Metabolic maintenance of cell asymmetry following division in activated T lymphocytes. **Nature**, 2016.

VIVIER, E.; ANFOSSI, N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 190-198, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programme on Traditional Medicine. *Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review*. Geneva: World Health Organization, 1998. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/63801>. Acesso em: 05/09/2024.

WITTE, K.; KOCH, E.; VOLK, H. D.; WOLK, K.; SABAT, R. The *Pelargonium sidoides* extract EPs 7630 drives the innate immune defense by activating selected MAP kinase pathways in human monocytes. **PLoS One**, v. 10, n. 9, e0138075, 2015.

WITTE, K.; KOCH, E.; VOLK, H. D.; WOLK, K.; SABAT, R. The herbal extract EPs® 7630 increases the antimicrobial airway defense through monocyte-dependent induction of IL-22 in T cells. **Journal of Molecular Medicine (Berl)**, v. 98, n. 7, p. 1085-1093, 2020.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**, Atheneu, 2014.

ZIMMERMANN-KLEMD, A. M.; REINHARDT, J. K.; WINKER, M.; GRÜNDEMANN, C. Phytotherapy in integrative oncology—an update of promising treatment options. **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3209, 2022.

ANEXOS

APROVAÇÃO CEP

Portal do Governo Brasileiro

 principal 

Público Pesquisador Alterar Meus Dados Fernanda Bernadelli De Vito - [V4.0.6_RC02
Sua sessão expira em: 39min 44

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: Avaliação do perfil imunológico de pacientes com neoplasias hematológicas e do efeito do tratamento in vitro com compostos fitoterápicos
 Pesquisador Responsável: Fernanda Bernadelli Garcia
 Contato Público: Fernanda Bernadelli Garcia
 Condições de saúde ou problemas estudados:
 Descritores CID - Gerais:
 Descritores CID - Específicos:
 Descritores CID - da Intervenção:
 Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 12/07/2023



DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
 Cidade: UBERABA

DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 8667 - Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HCUFTM)
 Endereço: Antiga Santa Casa - 2º andar (Acesso pela portaria principal do HC-UFTM) - Av. Getúlio Guarita, 130
 Telefone: (34)3318-5319
 E-mail: cep.hctm@ebesrh.gov.br

CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

[Voltar](#)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você a participar da pesquisa: Análise do efeito de *P. sidoides* sobre a capacidade de linfócitos citotóxicos eliminar células de linfoma e leucemia *in vitro*. Os avanços na área da saúde ocorrem por meio de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Sabe-se que a resposta imune pode ter importância fundamental no desenvolvimento de algumas doenças como as neoplasias hematológicas. A cada dia novos medicamentos têm o seu efeito anticâncer investigado e nós nos propomos a investigar o efeito da planta *Pelargonium sidoides* em células do sistema imunológico que são as responsáveis por destruir células neoplásicas no organismo.

Caso você aceite participar desta pesquisa, será necessário doar 15 mL de sangue. Esta quantidade retirada não será prejudicial à sua saúde. A coleta de sangue será realizada no braço, com material descartável, por um profissional capacitado. Você poderá ter algum desconforto quando receber a picada para colher o sangue do seu braço.

Você poderá obter todas as informações que julgar necessárias, fazer todas as perguntas que quiser, antes e durante o andamento da pesquisa, por meio dos pesquisadores do estudo. Sua participação é voluntária e, em decorrência dela, você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você não terá nenhum gasto por participar nesse estudo, pois qualquer gasto que você tenha por causa dessa pesquisa lhe será ressarcido. Você poderá não participar do estudo, ou se retirar a qualquer momento, sem que haja qualquer constrangimento junto aos pesquisadores, ou qualquer prejuízo, bastando você dizer ao pesquisador que lhe entregou este documento. Você não será identificado, pois a sua identidade será de conhecimento apenas dos pesquisadores da pesquisa, sendo garantido o seu sigilo e privacidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

Os resultados deste estudo serão mantidos em sigilo, podendo ser informados apenas à sua pessoa e só serão publicados em conjunto, não permitindo identificação individual. Sua participação é totalmente voluntária. Você tem direito a requerer indenização diante de eventuais danos que possa sofrer em decorrência dessa pesquisa.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Fernanda Bernardelli De Vito através do telefone: (34) 99196-5141 ou através do e-mail fernanda.vito@uftm.edu.br.

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e a quais procedimentos serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. E compreendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará o tratamento que estou recebendo. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do estudo. Concordo em participar do estudo “Análise do efeito de *P. sidoides* sobre a capacidade de linfócitos citotóxicos eliminar células de linfoma e leucemia *in vitro*”, e receberei uma via assinada deste documento.

Uberaba, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador assistente