

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP

Bruna Esteves

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTITUMORAL DOS EXTRATOS DE *Solidago chilensis*,
Aristolochia cymbifera E *Piper umbellatum***

Juiz de Fora

2017

BRUNA ESTEVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTITUMORAL DOS EXTRATOS DE *Solidago chilensis*,
Aristolochia cymbifera E *Piper umbellatum***

**Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Área: Imunologia e Doenças
Infecto-Parasitárias, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências
Biológicas: Área: Imunologia e Doenças
Infecto-Parasitárias**

Orientador: Prof. Dr. Gilson Costa Macedo

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Esteves, Bruna .

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL DOS EXTRATOS DE *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera* E *Piper umbellatum* / Bruna Esteves. -- 2017. 115 f.

Orientador: Gilson Costa Macedo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. *Solidago chilensis* . 2. *Aristolochia cymbifera*. 3. *Piper umbellatum*. 4. inflamação. 5. tumor. I. Macedo, Gilson Costa, orient. II. Título.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-TUMORAL DE DOS EXTRATOS DE *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera* E *Piper umbellatum*

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

Dissertação de Mestrado aprovada em:

___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr. Rafaela Chitarra Rodrigues Hell
Embrapa- Gado de Leite

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à Deus, que me guiou e me capacitou durante mais essa fase da minha vida.

Aos meus pais, Carlos e Rose, que sempre colocaram as minhas necessidades na frente das deles, por me apoarem e se esforçarem tanto para que eu pudesse chegar até aqui, sempre me incentivando e dizendo tudo o que eu precisava ouvir.

A minha irmã, Bell, que sempre esteve ao meu lado, disposta a me ajudar ou a me distrair.

Agradeço ao Sidnei, por todo companheirismo e amor, por entender as minhas ausências e por sempre me incentivar a fazer o meu melhor.

Ao meu querido orientador, Gilson, por toda paciência, pela amizade e por acreditar em mim. Obrigada pelos puxões de orelha que só permitiram meu crescimento.

Obrigada ao Prof. Ademar, Matheus e Poliana por cederem os extratos e estarem sempre dispostos a ajudar da melhor maneira possível. Obrigada pela confiança depositada em mim!

Obrigada à Família Lab, Dani, Ju, Lets, Thay, Marcela, Gabi, Paula Siano e Paula Dib, por sempre me ajudarem nas contas, nos experimentos e na vida. Sem vocês isso não seria possível! Obrigada pela amizade que construímos ao longo desses anos e por tornarem o laboratório um ambiente muito mais divertido e descontraído.

As minhas amigas que se tornaram também companheiras de casa, Xully, Louças e Cellyan. Agradeço a Deus por colocar vcs na minha vida! Obrigada pelos cafés, pelas discussões nada construtivas, por me manterem informada sobre as celebridades, por me acompanharem nas gordices, por me acalmarem nos momentos de desespero, enfim, obrigada pela amizade!!

Agradeço a todos do Laboratório de Imunologia, em especial, a Marcela, Marcilene e Flávia, por nos ajudarem tanto nessa reta final. Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

As Unidades de fomento, CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

As plantas medicinais são uma grande fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antitumoral de extratos de *Solidago chilensis* (G10, G11, G12), *Aristolochia cymbifera* (G13) e *Piper umbellatum* (G14). Estas espécies vegetais foram selecionadas com base em seu extenso uso na medicina popular para o tratamento de queimaduras, doenças reumáticas e inflamatórias, como sedativas, antipiréticas, entre outros. Como metodologia, primeiramente os extratos foram testados para sua citotoxicidade em células RAW264.7 (método de MTT). Em seguida, a atividade anti-inflamatória dos extratos foi determinada através da produção de óxido nítrico (método de GRIESS) e das citocinas TNF- α e MCP-1 (método de ELISA). Uma vez determinado o extrato mais promissor, sua ação foi avaliada sobre a produção de outras citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-12), bem como sobre a expressão de moléculas co-estimuladoras, proliferação celular e produção de IFN- γ . A influência do extrato no processo inflamatório também foi determinada *in vivo*, utilizando o modelo de edema de orelha. A atividade antitumoral foi determinada em linhagens murinas de câncer de mama (4T1) e de melanoma (B16) pelo método de MTT. Como resultados, nas concentrações não tóxicas, o extrato G14 foi o único capaz de reduzir a produção de NO, TNF- α e MCP-1, sendo assim selecionado para os testes posteriores. Este extrato também inibiu a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-12, a expressão dos coestimuladores CD40 e CD80, além de reduzir a proliferação de esplenócitos e a produção de IFN- γ . No ensaio *in vivo*, o extrato G14 foi efetivo em reduzir o edema, o infiltrado inflamatório, a produção de IL-1 β , IL-6 e MCP-1 assim como da enzima mieloperoxidase. Resultados semelhantes foram encontrados nos testes *in vitro* realizados com o 4-nerolidilcatecol, composto majoritário presente no extrato G14. Em relação a atividade antitumoral, o extrato G12 foi o que mais se destacou, reduzindo a sobrevivência das duas linhagens estudadas em até 50%. Os resultados apresentados nos permitem concluir que tanto o extrato G14 quanto o composto 4-NC foram efetivos na redução do processo inflamatório enquanto o extrato G12 se destacou por reduzir a sobrevivência de células tumorais.

Palavras-chave: *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera*, *Piper umbellatum*, inflamação, tumor.

ABSTRACT

Medicinal plants are a great source for the development of new medicines. In this context, the objective of the present study was to evaluate the anti-inflammatory and antitumor activity of *Solidago chilensis* (G10, G11, G12), *Aristolochia cymbifera* (G13) and *Piper umbellatum* (G14) extracts. These plant species were selected based on their extensive use in folk medicine for the treatment of burns, rheumatic and inflammatory diseases, such as sedatives, antipyretics, among others. As a methodology, the extracts were first tested for their cytotoxicity in RAW264.7 cells (MTT method). The anti-inflammatory activity of the extracts was determined by the production of nitric oxide (GRIESS method) and the cytokines TNF- α and MCP-1 (ELISA method). Once the most promising extract was determined, its action was evaluated on the production of other proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and IL-12), as well as on the expression of costimulatory molecules, cell proliferation and production of IFN- γ . The influence of the extract on the inflammatory process was also determined *in vivo* using the ear edema model. Antitumor activity was determined in murine (4T1) and melanoma (B16) murine cell lines by the MTT method.

As a result, in the non-toxic concentrations, the G14 extract was the only one able to reduce the production of NO, TNF- α and MCP-1, being thus selected for the subsequent tests. This extract also inhibited the production of IL-1 β , IL-6 and IL-12, the expression of CD40 and CD80 costimulators, as well as reducing splenocyte proliferation and IFN- γ production. In the *in vivo* assay, G14 extract was effective in reducing edema, inflammatory infiltrate, IL-1 β , IL-6 and MCP-1 production as well as the myeloperoxidase enzyme. Similar results were found in the *in vitro* tests performed as 4-nerolidylcaltechol, the major compound present in the G14 extract. In relation to the antitumor activity, G12 extract was the most outstanding, reducing the survival of the two strains studied by up to 50%. The results show that both the G14 extract and the 4-NC compound were effective in reducing the inflammatory process while the G12 extract was highlighted by reducing the survival of tumor cells.

Palavras-chave: *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera*, *piper umbellatum*, inflammation, tumor

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 <i>Solidago chilensis</i>	18
Figura 2 <i>Aristolochia cymbifera</i>	20
Figura 3 <i>Piper umbellatum</i>	22
Figura 4 Estrutura química do 4-nerolidilcatecol (4-NC).	23
Quadro 1 Denominação dos códigos utilizados para cada extrato.	34
Quadro 2 Frações obtidas por CLV do extrato G14.....	36
Quadro 3 Frações obtidas por CLV do extrato PU-EB.....	37
Figura 5 Cromatograma do 4-NC obtido em CLAE.....	38
Figura 6 Estratégia de gate.	44
Quadro 4 Organização dos grupos de animais para a avaliação in vivo da ação anti-inflamatória (edema de orelha) do extrato G14.....	46
Figura 7 Avaliação da citotoxicidade de extratos de <i>S. chilensis</i> , <i>A.cymbifera</i> e <i>P. umbellatum</i>	50
Figura 8 Avaliação da citotoxicidade dos extratos G10, G11, G13 e G14 nas novas concentrações selecionadas.....	51
Figura 9 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264.7 estimuladas e tratadas com os extratos de <i>S. chilensis</i> , <i>A. cymbifera</i> e <i>P.umbellatum</i>	53
Figura 10 Avaliação da citotoxicidade e da produção de NO de concentrações mais altas do composto G12.....	54
Quadro 5 Concentrações selecionadas para cada extrato.	55
Figura 11 Avaliação da produção da citocina TNF- α por células RAW 267.4 tratadas com os extratos de <i>S. chilensis</i> , <i>A. cymbifera</i> e <i>P. umbellatum</i> e estimuladas com LPS.	56
Figura 12 Avaliação da produção da quimiocina MCP-1 por células RAW 267.4 tratadas com os extratos de <i>S. chilensis</i> , <i>A. cymbifera</i> e <i>P. umbellatum</i> e estimuladas com LPS	58
Figura 13. Avaliação da produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, e IL-10 por células tratadas com o extrato G14 e estimuladas com LPS.....	61
Figura 14 Efeitos do tratamento com o extrato G14 na expressão de moléculas co-estimuladoras	63
Figura 15 Influência do extrato G14 na proliferação de células T	64

Figura 16 Avaliação da produção da citocina IFN- γ por esplenócitos com o extrato G14.....	65
Figura 17 Efeito do extrato G14 em edema de orelha em camundongos C57BL/6, induzido por óleo de cróton.....	66
Figura 18 Efeitos do tratamento com o extrato G14 em tecido auricular inflamado.....	68
Figura 19 Efeito do extrato G14 na produção de citocinas e mieloperoxidase a partir de edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	70
Figura 20 Avaliação da citotoxicidade do composto 4-nerolidilcatecol.....	71
Figura 21 Avaliação da produção de NO, das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e quimiocina MCP-1 em células tratadas com o composto 4-NC.....	73
Figura 22 Efeitos do tratamento com o composto 4-NC na expressão de moléculas co-estimuladoras, na proliferação de linfócitos e produção de IFN- γ	75
Figura 23 Avaliação da atividade antitumoral dos extratos de <i>S.chilensis</i> , <i>A. cymbifera</i> e <i>P. umbellatum</i> em células 4T1 e B16.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-NC – 4-Nerolidilcatecol

AA - Ácido aracdônico

AcOEt - Acetato de etila

AINEs - Anti-inflamatórios não-esteroidais

AP-1 – Proteína Ativadora 1

BCR - *B cell receptors* (Receptores de células B)

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCL2 - Proteína Quimioatrativa de Monócito do tipo 1

Células NK – Células *Natural Killer*

CLAE -Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (

CLV - Cromatografia Líquida à Vácuo

COX1 - Cicloxigenase 1

COX2 - Cicloxigenase 2

CXCL1 – Quimiocina Ligante 1 (Motivo C-X-C)

DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Dano

DCNT – Doenças Crônicas Não-Transmissíveis

DMSO – Dimetilsulfóxido

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

FLA2 – Fosfolipase A2

GSH – Glutationa

Hex - Hexano

IFN- γ – Interferon gama

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MIF - Média de intensidade de fluorescência

MCP-1 – Proteína quimioatrativa de monócitos do tipo 1

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NaNO₂ – Nitrito de sódio

NEED - naftiletenodiamino-bicloridrato

NF-κB – Fator de transcrição nuclear κB

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

O²⁻ - Superóxido

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PAF - Fator ativador plaquetário

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PGE2 - Prostaglandina E2

PKC - Proteína Quinase C

RANTES - Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

RNM- Ressonância magnética

SFB – Soro fetal bovino

TCR - *T cell receptors* (Receptores de células T)

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

TPA - 12-o-tetradecanóilphorbol-13-acetato

VEGF - Fatores de crescimento do endotélio vascular

µg/ml – Micrograma por mililitro

µM – Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	16
2.1.1 <i>Solidago chilensis</i>	17
2.1.2 <i>Aristolochia cymbifera</i>	19
2.1.3 <i>Piper umbellatum</i>	21
2.2 RESPOSTA IMUNE	23
2.2.1 Inflamação	24
2.2.2 Macrófagos e seus mediadores inflamatórios	26
2.2.3 Terapias Anti-inflamatórias.....	29
2.3 CÂNCER	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 PREPARO DOS EXTRATOS	35
4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO G14 E ISOLAMENTO DO 4-NC.....	36
4.3.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) do 4-NC.....	37
4.3 DILUIÇÃO DOS EXTRATOS.....	38
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
4.5 CULTURA DE CÉLULAS	39
4.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE (MTT).....	40
4.7 DOSAGEM DE NO.....	41
4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS.....	42
4.9 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS.....	42

4.10 ANIMAIS.....	44
4. 11 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE ESLENÓCITOS	45
4.12 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE ÓLEO DE CRÓTON	45
4.12.1 Determinação dos níveis de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e MCP-1)	46
4.12.2 Avaliação da Atividade Enzimática da MPO.....	47
4.12.3 Análise histológica.....	47
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS EXTRATOS DE <i>S. chilensis</i>, <i>A. cymbifera</i> E <i>P. umbellatum</i>	49
5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR CÉLULAS RAW 264.7 ESTIMULADAS E TRATADAS COM OS EXTRATOS DE <i>S. chilensis</i>, <i>A. cymbifera</i> E <i>P. umbellatum</i>	52
5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA CITOCINA TNF-α E QUIMIOCINA MCP-1 POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS EXTRATOS DE <i>S. chilensis</i>, <i>A. cymbifera</i> E <i>P. umbellatum</i>.....	55
5.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO G14 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IL-1β, IL-6, IL-12 e IL-10.....	59
5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COESTIMULADORES (CD40 E CD80) EM CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM O EXTRATO G14.....	62
5.6 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN-γ POR ESLENÓCITOS TRATADOS COM O EXTRATO G14.....	63
5.7 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DE RAÍZES DE <i>P. umbellatum</i> (G14) NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA.....	64

5.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO COMPOSTO MAJORITÁRIO 4-NEROLIDILCATECOL NA CITOTOXICIDADE E NA PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	70
5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CO-ESTIMULADORES (CD40 E CD80) EM CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM O COMPOSTO 4-NC.....	74
5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS EXTRATOS DE <i>S. chilensis</i> , <i>A. cymbifera</i> E <i>P. umbellatum</i> EM CÉLULAS 4T1 (CARCINOMA MAMÁRIO MURINO) E B16 (MELANOMA MURINO).....	76
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o mundo vem sofrendo uma mudança no perfil das doenças que acometem a população devido a uma transição demográfica, nutricional e epidemiológica. É notável a diminuição da incidência de doenças infectocontagiosas e um aumento progressivo nas doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) (DUARTE, 2010; BAYER; GOES DE PAULA, 1984).). Estas mudanças estão relacionadas a fatores como urbanização, acesso a serviços de saúde, mudanças no comportamento da população ocorridas nas últimas décadas devido ao grande avanço da tecnologia, melhoria nas condições de vida e saúde, redução da mortalidade e aumento da expectativa de vida. (ABEGUNDE et al., 2007). Dentre as DCNT destacam-se as doenças de caráter inflamatório e as neoplasias.

A resposta inflamatória representa um dos mais importantes mecanismos de defesa do organismo, porém, em determinadas condições patológicas ou se persistir por longos períodos, este processo pode se tornar altamente prejudicial às células normais do indivíduo, podendo causar danos irreparáveis. Assim, a inflamação é um processo que precisa ser muito bem controlado (BAUHMANN; GAULDIE, 1994; ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Quanto as neoplasias, a estimativa para o Brasil para os anos 2016/2017 aponta a ocorrência de cerca de 420 mil novos casos de câncer, com exceção do câncer de pele não melanoma, que corresponde a 180 mil novos casos. Destes novos casos, o câncer de próstata (61 mil) e o câncer de mama (58 mil) estão entre os mais frequentes. (INCA, 2016).

Já foi estabelecido que a resposta inflamatória exerce um importante papel no desenvolvimento tumoral, podendo atuar em diversas fases, como na iniciação, promoção, transformação maligna, invasão e até mesmo na metástase (GRIVENNIKOV et al, 2010). Um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento e agentes promotores de dano ao DNA é capaz de promover ou potencializar a transformação de células normais em células neoplásicas. Por este motivo, muitos tipos de câncer se originam a partir de infecções e inflamações crônicas (BALKWILL; MANTOVANI, 2012).

Infelizmente, tanto para as doenças de caráter inflamatório quanto para o câncer, os tratamentos atuais apresentam diversos efeitos adversos e, muitas vezes, não são eficazes para a cura (SILVA, ALBUQUERQUE e LEITE, 2010; PAWAR et al., 2012). Assim, o desenvolvimento de novos medicamentos que possam ser efetivos no tratamento destas enfermidades é de extrema necessidade.

A natureza é parte fundamental neste processo de busca por novas substâncias, visto que os produtos naturais são fontes importantes de novos agentes farmacêuticos e moléculas bioativas e precisam ser explorados (CRAGG; NEWMAN, 2013). Estudos feitos por Gullo e colaboradores (2006) relatam que dos novos fármacos utilizados para tratamento oncológico e de doenças inflamatórias, 60 e 75% respectivamente são desenvolvidos a partir de produtos naturais. Diante destes fatos, muitos estudos com plantas medicinais vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos.

Neste contexto, devido ao seu vasto uso na medicina popular, três plantas nativas, *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera* e *Piper umbellatum* foram selecionadas para avaliação da citotoxicidade, atividade anti-inflamatória e potencial antitumoral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Por milhares de anos, em todo o mundo, os produtos naturais têm desempenhado um papel de destaque na prevenção e tratamento de várias doenças (ELISABETSKY, 2003). O uso popular de plantas como ferramentas terapêuticas têm sido de grande valia na introdução de novas entidades químicas na medicina moderna (FILHO; YUNES, 1998). Associado a isso, estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas já vêm sendo realizados há vários anos. Dentre estes estudos destacam-se as novas técnicas espectroscópicas que permitem a elucidação, de forma mais rápida, de estruturas moleculares complexas oriundas de compostos naturais, que até pouco tempo não eram possíveis (FILHO; YUNES, 1998).

O Brasil é um país tropical que possui uma vasta biodiversidade, cujo potencial bioativo vegetal estimado é em torno de 10 a 20% das espécies de plantas do mundo inteiro (ALVES et al., 2001) e, além disso, existe também um processo de miscigenação intenso. Esses dois fatores resultaram numa quantidade de conhecimentos enorme sobre a sua flora e em um grande potencial para estudos com o foco em plantas medicinais. Portanto, os levantamentos etnofarmacológicos são ferramentas importantes na descoberta de novos medicamentos (RODRIGUES; CARLINI, 2003).

Atualmente, diversas plantas são utilizadas como medicamentos levando-se em conta a sabedoria popular. Aproximadamente 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional, onde o uso de produtos manufaturados a partir de extratos ou princípios ativos derivados de plantas ou até mesmo plantas *in natura* correspondem a maior parte das terapias tradicionais (WSH, 2006). Aproximadamente 119 substâncias químicas extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores são usadas na medicina e no mundo, e 77% destas são derivadas de plantas usadas na medicina tradicional (FRÖHLICH, et al., 2010).

Constituintes potentes podem ser transformados em produtos medicinais através do isolamento dos componentes ativos da planta e administração destes

compostos puros, gerando uma composição consistente e uniforme. Para isso, é necessário que haja uma padronização para garantir a utilização segura e autêntica do fitoterápico, de acordo com os parâmetros de qualidade. (CELEGHINI et al., 2001). O aumento das propriedades desejadas e a diminuição dos efeitos adversos podem ser outros objetivos para o melhoramento destas substâncias naturais. (FRÖHLICH, et al., 2010).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais (HAVSTEEN et al., 1983; FILHO, 1995). Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais. Sob este aspecto, é importante ressaltar que o sucesso das investigações na área de princípios ativos naturais depende, principalmente, do grau de interação entre a Botânica, a Química e a Farmacologia (FILHO; YUNES, 1997).

Nesse contexto, selecionamos três espécies já utilizadas na medicina popular, a fim de avaliar seus potenciais anti-inflamatórios e antitumorais.

2.1.1 *Solidago chilensis* Meyen

O gênero *Solidago* pertence à família Asteraceae e tem cerca de 120 representantes (WEBER; JAKOBS, 2005). Algumas espécies como *Solidago canadenses* L., *Solidago odora* e *Solidago gigantea* são nativas da América do Norte e hoje estão distribuídas em várias partes do globo. Outras espécies são nativas da Ásia e Europa, como a *Solidago virgaurea*. (CABRERA, 1974).

Na América do Sul, a espécie mais abundante é a *Solidago chilensis* Meyen, conhecida como “arnica”, “arnica-brasileira”, “erva-lanceta”, “cordão de ouro”, entre outros nomes (**Figura 1**). São nativas do Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai, Peru e Argentina, podendo ser encontradas em lavouras, campos e beira de estrada. (SIMÕES et al., 1998; VILA et al., 2002).



Figura 1: *Solidago chilensis*. Fonte: www.geocities.com

Solidago chilensis é uma erva perene, apresenta ramos eretos, rizomatosa, de caule simples, não ramificado, com coloração verde acinzentada da parte inferior e verde clara na parte superior, mede até 120cm de altura. Suas folhas são simples, alternas, elípticas, inteiras, membranosas e ásperas ao toque. As inflorescências tem cor amarela e são grandes panículas, chegando a até 20cm (OLIVEIRA, et al., 1991; LORENZI; MATOS, 2002).

Estudos fitoquímicos demonstraram que espécies de *Solidago* apresentam em suas partes aéreas sesquiterpenos (SCHMEDA-HIRSHMANN,1988), flavonóides como a quercetina e a rutina (GÜNTNER et al., 1999) e diterpenos labdânicos (SCHMEDA-HIRSHMANN,1988), enquanto das raízes já foram isolados diterpenos como solidagenona, desoxissolidagenona, solidagolactona e outros derivados do solidagolactol (TORRES, et al., 1989; SCHMEDA-HIRSHMANN,1988).

Apesar de seu uso ter iniciado somente no século XIX, as propriedades medicinais das espécies de *Solidago* já são descritas desde o século XIII (DIGEST,

2001). Na medicina popular, esta planta é utilizada como diurética, no tratamento de queimaduras e de doenças reumáticas e inflamatórias, principalmente na redução de dor e edema. Além disso, também é estimulante gastrointestinal, cicatrizante e antisséptico (LORENZI; MATOS, 2002; MOREL et al., 2006).

Goulart e colaboradores (2007), demonstraram que os extratos aquosos de raízes, folhas e flores possuem propriedades anti-inflamatórias através da inibição da função de leucócitos na inflamação aguda induzida por carragenina, em modelo *in vivo*. O extrato aquoso de raiz se destacou, pois inibiu a atividade das enzimas mieloperoxidase, adenosina-deaminase e do TNF- α , além de reduzir a migração leucocitária. Em ensaio *in vitro*, já foi demonstrado que os extratos orgânicos das raízes, folhas e caules apresentaram atividade antitumoral em células humanas, HT29 (adenocarcinoma de cólon) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão), na concentração de 100mg/ml (MONKS et al. 2002). Apesar desses dados, estudos com os extratos hidroalcoólicos de raízes e de partes aéreas voltadas para atividade anti-inflamatória e antitumoral, ou que demonstrem a ação sobre o sistema imune, ainda não foram realizados.

2.1.2 *Aristolochia cymbifera*

O gênero *Aristolochia* pertence à família Aristolochiaceae, que por sua vez é formada por 7 gêneros e apresenta cerca de 400 espécies. Essas plantas são encontradas principalmente em regiões tropicais, porém, algumas espécies crescem em regiões de clima subtropical ou até mesmo temperado (KELLY; GONZÁLEZ, 2003). Das 300 espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia*, 90 são nativas do Brasil (LEITÃO; KAPLAN, 1992). Por ser uma espécie nativa, damos destaque à *A. cymbifera*, conhecida como cipó mil-homens, jarrinha, cassaú, papo-de-peru, entre outros nomes (**Figura 2**) (WU et al. 2004).

Segundo a descrição de Ferri (1969), *A. cymbifera* é uma planta herbácea, rastejante ou trepadeira, com folhas alternadas membranosas orbiculares-reniformes, apresentando flor zigomorfa com perianto formando um grande papo encimado por tubo bilabiado, totalmente pintalgada em tons castanho-avermelhados mesclados

com outras cores mais claras. No interior do tubo encontram-se numerosos pelos. A flor exala um odor de carne podre, o que atrai insetos.

Já foi demonstrado que plantas do gênero *Aristolochia* apresentam em sua estrutura alcaloides, flavonoides, ésteres fenólicos, óleos voláteis e ácidos aristolóquios (TREASE; EVANS. 1980). Em raízes e caule de *A. cymbifera* também são encontrados diterpenos enquanto as folhas possuem sesquiterpenoides. (LORENZI; MATOS, 2002). Popularmente, estas plantas são utilizadas como diurética, sedativa, anti-séptica e emenagoga (facilita ou aumenta o fluxo menstrual), podendo atuar também contra a anorexia e dispepsia (LORENZI; MATOS, 2002).



Figura 2: *Aristolochia cymbifera*. Fonte: www.buyrareseeds.com

Diversos estudos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar o potencial terapêutico da *A. cymbifera*. Carvalho e colaboradores (2008), demonstraram que o extrato metanólico das folhas tem propriedades antimicrobianas, mostrando atividade contra promastigotas de *Leishmania chagasi*. Outros estudos também comprovaram efeito antibacteriano, inibindo o crescimento de *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans* em biofilme artificial (MACHADO et al. 2005).

Além disso, o extrato alcoólico exibiu grande ação antioxidante, quando avaliado pelo método de DPPH (ALVIANO et al., 2008). Os extratos de *A. cymbifera* apresentaram também ação anti-*Trypanossoma cruzi* (ABE et al., 2002). Entretanto, ainda não foram descritas na literatura as atividades anti-inflamatória e antitumoral do extrato hidroalcoólico desta planta.

Apesar de muito utilizada para fins medicinais, estudos já descreveram produtos do seu metabolismo considerados tóxicos. Os ácidos aristolóquicos são metabólitos secundários que já demonstraram ação tóxica nos rins e fígado (ZHOU et al., 2004). Além disso, na presença de aristolactamas, esses ácidos possuem um potencial altamente mutagênico, degradando o DNA e contribuindo para o desenvolvimento de neoplasias. (KOHARA et al., 2002).

2.1.3 Piper umbellatum

A espécie *Piper umbellatum* pertence à família Piperaceae, sendo o gênero *Piper* um dos maiores gêneros de plantas com flores, apresentando cerca de 2.000 espécies (WANKE et al., 2007). A taxonomia desse gênero é complexa devido ao grande número de representantes e a uniformidade de suas flores. Por isso, a *P. umbellatum* já foi classificada nos gêneros *Lepianthes* por Rafinesque, *Heckeria* por Kunth e *Pothomorphe* por Miquel (TEBBS, 1923). Entretanto, esta espécie foi incluída no gênero *Piper* devido a análises filogenéticas de suas inflorescências. (JARAMILLO et al., 2008; JARAMILLO; MANOS, 2001).

Em relação a distribuição geográfica, esta é uma espécie neotropical encontrada na América do Sul, América Central, Caribe e México. Apesar de não serem nativas da África e Ásia, são bem adaptadas e desenvolvem-se naturalmente (LORENZI; MATOS, 2002; ROERSCH, 2010). No Brasil, são conhecidas como caapeba, papiparoba, aguaxima, malverisco, catajé, entre outros, e estão distribuídas por todo o país, com destaque para o sul da Bahia até Minas Gerais e São Paulo (DI STASI; LORENZI; MATOS, 2002). (**Figura 3**)

Na medicina popular são utilizadas suas folhas, hastes e raízes como diuréticas, antiepiléptica, antipirética, contra inflamação das pernas, inchaços, filaríose e doenças do fígado. (LORENZI; MATOS, 2002).

Já foi comprovada atividade antibacteriana de um alcalóide das partes aéreas de *P. umbellatum* contra *Helicobacter pylori*, o que confere uma proteção contra úlceras gástricas. (ISOBE; OHSAKI; NAGATA ,2002). Perazzo e colaboradores (2005), comprovaram a atividade inflamatória e propriedades analgésicas e de segurança com a administração via oral do extrato hidroetanólico bruto das partes aéreas, em experimento *in vivo*. Além disso, estudos realizados com extratos, frações ou compostos isolados já verificaram atividade antileishmania (BRAGA et al., 2007), antiplasmódica (KAMANZI ATINDEHOU et al., 2004), antifúngica (RODRIGUES et al., 2012), antiofídica (NÚÑEZ et al., 2005), fotoprotetora, (DA SILVA et al., 2005; 2009) e atividade antioxidante (BARROS, 1996; FERNANDES et al., 2013; LOPES et al., 2013). Alguns estudos também evidenciaram atividade antineoplásica frente a linhagens de câncer de mama, melanoma, próstata, colón, rins, leucemia e ovários (BROHEM et al., 2009; SACOMAN et al., 2008).



Figura 3: *Piper umbellatum*. Fonte: www.phytoimages.siu.edu

O composto majoritário dos extratos de *P. umbellatum* é o 4-nerolidilcatecol (4-NC), que é um metabólito secundário que tem sido apontado como o responsável por grande parte das atividades biológicas da espécie (**Figura 4**) (KIJJOA, 1980). Dentre estas atividades, a de maior destaque é a antioxidante (BARROS, 1996; ROPKE, 2000; ROPKE et al.,2002), que é ainda mais evidente em extratos de raízes (ROPKE et al., 2006).

Apesar de suas diversas atividades, o potencial imunomodulador da espécie *P. umbellatum* ainda não foi completamente investigado.

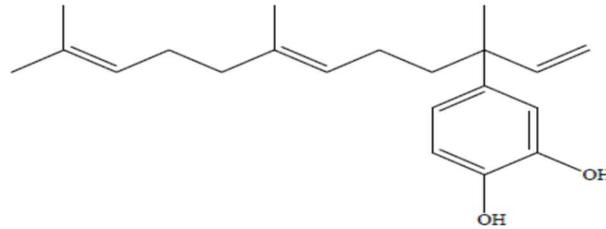


Figura 4: Estrutura química do 4-nerolidilcatecol (4-NRC). (KIJJOA, 1980)

2.2 RESPOSTA IMUNE

O Sistema Imunológico é constituído por órgãos, células e moléculas que tem a finalidade de manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral (SOUZA, et al., 2010). Para isso, este complexo sistema usa diversos mecanismos que controlam e eliminam as causas da agressão (CHAPLIN, 2006).

Existem receptores de reconhecimento de padrões moleculares que são capazes de detectar o antígeno ou a célula danificada, e assim, o Sistema Imune desenvolve uma resposta para a eliminação do microorganismo, toxina ou da célula danificada sem causar dano ao tecido (CHAPLIN, 2006). Estes receptores estão presentes em vários tipos celulares, como células endoteliais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos B. (TAKEDA, 2005).

A imunidade inata, ou imunidade natural, é a primeira linha de defesa contra micro-organismos potencialmente patogênicos. É constituída por barreiras físicas, químicas e biológicas, células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células Natural Killer (NK), células dendríticas, proteínas do sangue, citocinas e quimiocinas que respondem rapidamente às infecções (ABBAS et al, 2011; MEDZHITOV, 2000). A imunidade inata é capaz de diferenciar o “self” do “non self”, o que significa que ela identifica estruturas estranhas ao organismo, e responde imediatamente após o contato, tentando eliminar tal estrutura (FOX-MARSH & HARRISON, 2002).

Diferente da imunidade inata, a imunidade adaptativa é altamente específica ao antígeno que a induziu e, além disso, consegue desenvolver memória imunológica

e responder com mais intensidade a exposições posteriores daquele microorganismo (FLAJNIK, 2004). Os principais componentes da imunidade adaptativa são os linfócitos T e B e seus produtos, como os anticorpos e citocinas. A especificidade acontece em virtude dos receptores antígeno-específicos presentes na superfície desses linfócitos, que são os TCR (*T cell receptors*) e BCR (*B cell receptors*) (ALAM, 2003).

Embora sejam frequentemente descritas separadamente, a imunidades inata e adaptativa atuam em sincronismo, sendo a resposta inata a primeira linha de defesa, onde os patógenos são reconhecidos e combatidos por diversos tipos celulares como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, ou por fatores solúveis como as proteínas do complemento e citocinas. Só então, a resposta adaptativa é ativada através da apresentação de antígenos aos linfócitos, iniciando assim a resposta antígeno-específica (RIDPATH; FLORES, 2007).

Dentre os diversos mecanismos efetores utilizados pela imunidade inata para combater precocemente o agente invasor, a inflamação está entre os mais importantes e eficientes, sendo o foco de diversos estudos (CRUVUNEL et al., 2010).

2.2.1 Inflamação

Nos últimos anos, tem sido demonstrado um grande interesse na busca por respostas a etiologia fisiopatológica e controle farmacológico do processo inflamatório. A causa disso é a descoberta de que danos teciduais que podem ocorrer em várias doenças resultam da resposta inflamatória (FAVACHO, 2009).

No contexto de imunidade inata, a inflamação é o principal mecanismo efetor. A resposta inflamatória é um processo fisiológico que ocorre após reconhecimento de microrganismos, injúria tecidual ou até mesmo por algum estímulo neurogênico onde são liberados diversos mediadores químicos capazes de provocar alterações nos componentes humorais e celulares. Dentre elas, o direcionamento de células circulantes ao sítio inflamatório com o intuito de eliminar o agente invasor e/ou reparar o tecido lesado. O desenvolvimento de todo esse processo é evidente por meio dos sinais clínicos típicos desta resposta: rubor, calor, dor, edema e perda de função (CRUVINEL et al., 2010; SERHAN et al., 2008). Assim, a inflamação tem como

finalidade combater o agente agressor, bem como eliminar produtos da destruição celular de forma a promover condições ideais para o reparo do tecido (TEDGUI, 2011).

O tempo de duração e as características patológicas vão determinar as fases da inflamação: aguda e crônica. A fase aguda pode durar minutos, horas ou alguns dias e é caracterizada por infiltrado predominantemente neutrofílico (GORDON, 2007; ROCHA, 1979). Já a inflamação crônica acontece dentro de semanas ou meses, e é associada a presença de linfócitos e macrófagos, bem como a destruição tecidual e tentativa de reparação (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

A resposta inflamatória aguda se inicia imediatamente após a injúria tecidual ou reconhecimento do invasor, e apresenta três eventos de grande importância: 1) aumento da dilatação dos vasos e da permeabilidade capilar (CIRINO et al., 2003), gerado por mediadores como prostaglandinas, leucotrienos, serotonina e histamina, oriundos principalmente de macrófagos e mastócitos (LECCI, 2000). Este aumento da permeabilidade permite a chegada de células, anticorpos e fatores de fase aguda ao sítio inflamatório (ALLER et al., 2007; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004); 2) extravasamento de exsudato rico em proteínas para o meio extravascular, que se acumula no sítio inflamado, caracterizando o edema (PATTERSON, 2001); 3) migração de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no foco da lesão (ROCHA, 1979; ROBBINS, 2005).

Para que ocorra a migração de leucócitos para o sítio inflamatório, células residentes do tecido secretam citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas IL-1 e IL-6, que são capazes de estimular a secreção de quimiocinas como CCL-2 (ou MCP-1- Proteína Quimioatrativa de Monócitos do tipo 1) e CXCL1 (Quimiocina CXC com especificidade para os receptores CXCR2), além de induzir as células endoteliais a expressarem selectinas e integrinas. Estas últimas são conhecidas como moléculas de adesão que promovem a ligação dos leucócitos a parede dos vasos sanguíneos próximos ao local da inflamação. Assim, em conjunto, estes fatores levam neutrófilos e monócitos a migrarem para o tecido inflamado, realizando a diapedese (MESQUITA, et al., 2008; GILMAN et al., 2006).

No sítio inflamatório, neutrófilos e macrófagos fazem o reconhecimento do agente agressor e o fagocitam, além de liberarem enzimas lisossomais, a fim de destruir este agente causador da inflamação (RODRIGUES et al., 2002). A ativação de mastócitos e agregação plaquetária também ocorrem ainda no foco da inflamação,

resultando na liberação de mais mediadores quimiotáticos, potencializando o evento (TAN et al., 1999).

Uma vez eliminado o agente causador da inflamação, os macrófagos assumem o papel de reparo tecidual dos ferimentos, remoção de células danificadas e remodelamento do tecido lesado (KLIMP et al., 2002).

2.2.2 Macrófagos e seus mediadores inflamatórios

Os macrófagos são células de extrema importância nas diferentes fases da resposta imune e, principalmente, na inflamação. Dentre suas diversas funções, está a ligação entre a resposta inata e adaptativa (VILLACRES-ERIKSON, 1995), recrutamento de outros tipos celulares ao sítio inflamatório, remoção de células danificadas e reparo tecidual (WERB; GORDON, 1975).

Após uma infecção ou injúria tecidual, PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano) são liberados e reconhecidos por células da imunidade inata. Dentre estas células destacam-se os macrófagos, que já se encontram residentes no tecido. Após o reconhecimento do invasor ou de estruturas oriundas do tecido lesado, os macrófagos se ativam e, dentre outras funções, produzem diversos mediadores inflamatórios como o Óxido Nítrico (NO), citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (KLIMP et al., 2002). A produção destes mediadores precisa ser muito bem controlada pois, de outra forma, estas mesmas moléculas podem causar dano tecidual e desenvolvimento de fibrose (KLIMP et al., 2002; SIVEEN; KUTTAN, 2009).

O óxido nítrico é um gás solúvel, sintetizado a partir da L-arginina pela ação da enzima NO sintase (NOS), que por sua vez, apresenta três isoformas, dentre elas duas constitutivas: a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS); e uma induzida (iNOS), que está diretamente relacionada ao processo inflamatório (DRAY, 1995; NATHAN, 1997; THIEMERMAN, 1997). A diferença entre estas formas é que as NOS constitutivas aumentam sua expressão de acordo com o fluxo de cálcio, enquanto a iNOS é produzida, principalmente, na presença de citocinas pró-inflamatórias. (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004).

Dependendo da quantidade produzida, o NO pode apresentar efeitos benéficos ou maléficos. Uma vez produzida, a enzima iNOS gera grandes quantidades de NO

que, na presença de superóxido (O_2^-) reagem formando peroxinitrito ($ONOO^-$), que, por sua vez, é capaz de lesionar moléculas alvo, como proteínas, glutathiona (GSH), mitocôndrias e DNA, causando vários danos celulares. Por outro lado, este mesmo mecanismo promove sua importante função microbicida (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). Além disso, o NO possui ação vasodilatadora, reduz a agregação e adesão plaquetária, promove neurotransmissão e dor (MONCADA et al., 1991).

A produção de NO também é capaz de diminuir o recrutamento leucocitário em condições normais e quando seus níveis são reduzidos, o promove o rolamento e adesão de leucócitos (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003). Além disso, o NO é capaz de ativar as enzimas cicloxigenase 1 e 2 (COX1 e COX2), aumentando a produção de prostaglandinas que podem potencializar os processos inflamatórios (ASANUMA et al., 2001). Níveis elevados de NO já foram relacionados a uma série de patologias como doenças degenerativas, incluindo inflamação, doenças reumáticas, choque séptico, diabetes e isquemia cerebral (BARRETO, et al, 2005).

Além do NO, os macrófagos são importantes fontes de citocinas que estão intimamente ligadas ou processo inflamatório. Dentre elas é importante destacar o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), a interleucina 1β (IL- 1β), a IL-6 e a IL-12. O $TNF-\alpha$ é uma das citocinas cruciais nos processos inflamatórios, bem como na regulação da imunidade e na diferenciação e a morte celular. Além dos macrófagos, esta citocina pode ser produzida por neutrófilos, linfócitos T, células *Natural Killer* (NK) e monócitos e sua síntese pode ser estimulada por $IFN-\gamma$, IL-1, IL-2, fator ativador plaquetário (PAF), entre outros fatores. Por outro lado, sua produção pode ser inibida por ciclosporina, dexametasona e prostraglandina E2 (PGE2) (CLARK, 2007).

Estudos já demonstraram que o $TNF-\alpha$ e a IL- 1β apresentam ações sobrepostas, como alterações endoteliais, atividade quimiotática e estímulo ao metabolismo oxidativo. Além disso, o $TNF-\alpha$ induz a liberação de quimiocinas que auxiliam no recrutamento de leucócitos (BRADLEY, 2008). Além disso, essa citocina aumenta a reabsorção óssea, a atividade de adipócitos, a expressão de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) p de classe (I e II) e também é capaz de estimular a produção de IL-6, que por sua vez estimula hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda da inflamação (VARELLA; FORTE, 2001). O $TNF-\alpha$ pode ainda atuar no hipotálamo para induzir a febre, juntamente com a IL- 1β e IL-6, o que faz destas citocinas pirógenos endógenos (SUNDGREN-ANDERSSON et al., 1998; MURRAY et

al., 2006). Este mecanismo permite o aumento da temperatura corporal, reduzindo a viabilidade dos patógenos e estimulando a resposta imune (MORRISON, et al., 2008)

Além de auxiliar na indução da febre, a IL-1 β também estimula a liberação de proteínas de fase aguda, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e induz o recrutamento de leucócitos (DINARELLO, 1998). Também atua indiretamente como um mediador hipernociceptivo, através do estímulo de expressão de COX2 (VERRI et al., 2006).

A IL-6, por sua vez, atua em diversas células-alvo e possui muitas atividades biológicas, como principalmente a regulação de respostas inflamatórias e imunes. O TNF- α e a IL-1 β são os principais indutores de sua biossíntese.(CHAI et al., 1996). Esta citocina está relacionada a diferenciação de linfócitos B, assim como a secreção de imunoglobulinas, proliferação de linfócitos T, e ainda, a síntese de proteínas de fase aguda. (LOTZ et al. 1988, EBERSOLE e CAPELLI 2000).

Outros fatores de grande importância na inflamação são as quimiocinas. Estas proteínas são responsáveis por coordenarem tanto o tráfego de leucócitos quanto a diferenciação de células imunológicas (CONRAD et al., 2007). Um grupo de quimiocinas que se destaca em nosso trabalho é a MCP-1, conhecida por atrair e ativar monócitos, células dendríticas, células NK, basófilos e linfócitos T. Além disso, em altas concentrações, esta quimiocina induz a produção de reativos intermediários de oxigênio e óxido nítrico, podendo atuar na eliminação de patógenos (CONRAD et al., 2007; BHATTACHARYYA et al., 2002).

Conforme mencionado previamente, os macrófagos são capazes de ativar a resposta imune adquirida através do processo de apresentação de antígenos aos linfócitos T. Para isso, macrófagos ativados fagocitam, processam e apresentam antígenos aos linfócitos T CD4+ através das moléculas de MHC de classe 2, sendo necessário um segundo sinal, dado pela expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86. Além disso, os macrófagos são capazes de direcionar a diferenciação dos linfócitos para o perfil Th1, uma vez que produzem quantidades significativas da citocina IL-12. Neste contexto, linfócitos e macrófagos trabalham de maneira bidirecional visto que linfócitos Th1 produzem a citocina interferon gama (IFN- γ) que ativa ainda mais macrófagos, estimulando principalmente a produção de NO. Além disso, O IFN- γ aumenta a citotoxicidade mediada por células NK e T CD8+ citotóxicas e estimula ainda mais a produção de IL-12, amplificando assim a resposta (GOODRIDGE et al., 2003; ROBBINS; CONTRAN, 2005; ABBAS et al., 2011).

De modo geral, esses mediadores são fundamentais para o desenvolvimento de uma reação inflamatória e sua inibição pode resultar na modulação negativa da inflamação. Assim, compostos com potencial para modular a resposta de macrófagos seriam de grande importância para o tratamento de doenças inflamatórias.

Outra citocina importante sintetizada por macrófagos é a IL-10. Esta molécula atua de forma oposta as outras citocinas já mencionadas por se tratar de uma citocina anti-inflamatória, de ação pleiotrópica (MOSMANN et al., 1994). A principal função da IL-10 é a regulação do sistema imune, evitando respostas exacerbadas. Sua ação é executada principalmente através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, atua no sistema vascular, inibindo as interações entre leucócitos e células endoteliais. Desta forma, a IL-10 age como feedback negativo, já que deprime a resposta de macrófagos ativados, direcionando o sistema imune ao seu estado de repouso a medida que o agente causador é controlado (CHOI et al., 2007).

2.2.3 Terapias Anti-inflamatórias

Uma das classes de fármacos mais utilizadas no tratamento de dores agudas e crônicas decorrentes do processo inflamatório, são os anti-inflamatórios não-esteróides (AINE's) (NA et al., 2006). Sua atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética ocorre pela inibição da síntese de prostaglandinas por meio do bloqueio das enzimas COX1 e COX2. A COX1 é uma enzima constitutiva, encontrada em vários tecidos e desempenha sua função ao promover a homeostasia. A COX2, por sua vez, é induzida durante o processo inflamatório, atuando principalmente no metabolismo do ácido aracídico com consequente produção de prostaglandinas que potencializa o processo inflamatório (SILVA, et al., 2014). Entretanto, diversos efeitos adversos estão relacionados ao uso exacerbado destes medicamentos, principalmente no trato gastrointestinal, podendo afetar também a função renal, hepática, cardiovascular e trombótica (KUMMER e COELHO, 2002). Em relação a função gastrointestinal, usuários de AINES apresentam um risco 3 a 4 vezes maior de perfuração e ulceração gástrica (BUTTGEREIT, et al., 2001).

Outro grupo de fármacos muito utilizado é o dos glicocorticoides, que apresentam efeitos anti-inflamatórios e imunossupressivos. Existem diversos mecanismos com os quais estes medicamentos reduzem a inflamação, porém o

principal é a inibição da expressão de genes relacionados a produção de citocinas através da supressão da ativação de fatores de transcrição como NF- κ B (Fator de Transcrição Nuclear κ B) e AP-1 (Proteína Ativadora 1) (ANTI, et al., 2008). Neste contexto, destaca-se a dexametazona, que como consequência da inibição destes fatores de transcrição, atua também na inibição da produção de diversas citocinas e quimiocinas como, IL-1, IL-6, IL-12, IL-8, MCP-1 e RANTES (Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais) (BARNES, 1998). Além disso, este fármaco atua sobre diversos mediadores e células inflamatórias, agindo também sobre os vasos sanguíneos e na distribuição de leucócitos periféricos (ROBERT, et al., 1995). Os glicocorticoides também reduzem a expressão de genes relacionados a COX2 e ainda induzem a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (DINARELLO, 2010). Apesar de apresentarem atividade sobre todos os tipos de reações inflamatórias, estes fármacos também possuem diversos efeitos adversos associados, visto que interferem no metabolismo geral do organismo (RANG et al., 2003), podendo causar osteoporose, hipertensão arterial, úlcera, hiperglicemia, e além disso, torna o indivíduo muito susceptível a infecções devido a sua considerável ação imunossupressora (RANG et al., 2003; YEAGER, et al., 2004; ANTI et al., 2008).

Além destes medicamentos, algumas terapias utilizando anticorpos têm sido desenvolvidos no intuito de inibir a atividade de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-1 β e IL-6) ou seus receptores. Essas terapias são promissoras visto que quase não apresentam toxicidade ao organismo, pois atuam principalmente no meio extracelular, diferente dos AINEs e glicocorticoides que atuam no meio intracelular. A efetividade destas abordagens já foi demonstrada no tratamento de artrite reumatoide, psoríase, esclerose múltipla, entre outras doenças. Por outro lado, esta estratégia também diminui a defesa do sistema imune contra infecções e câncer (DINARELLO, 2010).

Uma vez que os medicamentos disponíveis para tratamentos de doenças inflamatórias apresentam muitos efeitos adversos, mais estudos são necessários para o desenvolvimento de novas estratégias que sejam mais eficazes para o tratamento de tais enfermidades mas que não sejam prejudiciais a estes pacientes.

2.3 CÂNCER

O Instituto Nacional do Câncer define essa enfermidade como o conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células com capacidade de invadir órgãos e tecidos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. As células cancerosas tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, promovendo seu acúmulo, dando origem aos tumores ou neoplasias malignas. No caso da formação de uma massa de células que se multiplicam de forma mais lenta e se assemelham ao tecido original, são chamadas de neoplasias benignas, que raramente apresentam risco de vida (INCA, 2016).

As neoplasias não possuem uma causa única. São múltiplos os fatores relacionados ao aumento do risco para desenvolver a doença: idade, fatores endócrinos, história reprodutiva, fatores comportamentais e fatores genéticos (ADAMI et al., 2008).

Segundo a OMS (2014), o câncer é um problema de saúde pública, que tem maior destaque entre os países em desenvolvimento. Dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025, estima-se que 80% ocorrerão nestes países. No Brasil, as estimativas para os anos de 2016-2017 indicam aproximadamente 600 mil novos casos de câncer.

Dentre os diversos tipos de câncer, o de mama é a neoplasia de maior incidência entre mulheres na faixa etária de 40 a 59 anos, com cerca de 1,7 milhões de novos casos todos os anos (INCA, 2016). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer, só no Brasil, estes novos casos chegaram a 57.960, no ano de 2016. Levando-se em consideração os diversos tipos de câncer, o câncer de mama é o quinto na lista dos mais letais com aproximadamente 522.000 óbitos por ano no mundo e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres (OMS, 2016).

Outro tipo de câncer que se destaca é o melanoma, que apesar de menos incidente, é um tipo de câncer muito agressivo devido a sua alta capacidade de metástase (MILLER, 2006). O melanoma cutâneo é uma neoplasia que se origina da transformação dos melanócitos (células produtoras de melanina) (SLINGLUFF, 2011) e representa aproximadamente 4% de todas as neoplasias malignas da pele. Nos últimos anos, o melanoma cutâneo vem se tornando um problema de saúde pública, devido ao aumento no número de novos casos (GRAY-SCHOPFER et al., 2007). Em 2016, o Instituto Nacional do Câncer, fez uma estimativa de 5.670 novos casos no

Brasil, sendo 3.000 em homens e 2.670 em mulheres. A disseminação metastática acomete principalmente a pele, subcutâneo e linfonodos (42-59%), seguidos pelo pulmão (18-36%) (MEYERS; BALCH, 1998), e até o presente momento, não há uma cura efetiva para pacientes com melanoma disseminado. (WEINLICH, 2003; HOMSI, 2005).

O processo inflamatório parece estar diretamente envolvido no surgimento de um câncer. Uma inflamação pode atuar como um fator inibidor ou facilitador para o crescimento desordenado e exacerbado de células, e conseqüentemente para a progressão de um tumor. No início da inflamação, as células inflamatórias agem como promotoras do tumor, pois produzem um microambiente rico em fatores de crescimento, estroma ativado e agentes que facilitam a alteração no DNA celular, através da geração de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, possibilitando assim, transformações neoplásicas. No entanto, a progressão tumoral pode ser prejudicada pelo recrutamento de células inflamatórias, que representam a resposta do hospedeiro, que tem a intenção de inibir o crescimento do tumor.(COUSSENS; WERB, 2002). Assim, compostos que alterem o curso da inflamação podem também ser úteis no tratamento do câncer. Esta proposição já vem sendo alvo de muitos estudos (BARON e SANDLER, 2000; FUNKHOUSER e SHARP, 1995; CASTONGUAY et al., 1998; AKASHI et al., 2000).

O tratamento do câncer é diverso, podendo envolver procedimentos locais como a cirurgia e radioterapia ou procedimentos sistêmicos como a quimioterapia e hormonioterapia (BROWN et al., 2004).

A quimioterapia é o procedimento mais utilizado no tratamento do câncer. Ela consiste no uso de agentes químicos isolados ou em combinação, promovendo a supressão do crescimento celular (COSTA-LOTUFO, 2010). Seu uso é mais eficaz no início da carcinogênese, podendo levar a cura ou ao controle da doença, visando sempre uma melhoria na qualidade e sobrevida do paciente (HASIMA e AGGARWAL, 2012; MA e WANG, 2009).

Os agentes quimioterápicos disponíveis no mercado não são completamente específicos para as células tumorais, agindo também em células normais, causando grande prejuízo funcional, o que leva o paciente a um quadro de imunossupressão e grande debilidade física (BROWN et al., 2004; FIRZUK et al., 2011). Dentre os efeitos colaterais da quimioterapia estão náuseas, vômitos, constipação, diarreia, anorexia, e fadiga (ANJOS & ZAGO et al., 2006). Além disso, diversos tipos de câncer têm

desenvolvido resistência às drogas, o que torna o problema ainda maior (SHUKLA et al., 2012). Por isso, atualmente há uma intensa busca por novos medicamentos que sejam específicos para as células tumorais com o mínimo de efeitos adversos.

Dentro deste contexto, muitos estudos vêm sendo realizados a partir de produtos naturais. Diversas classes de compostos já foram testadas e muitas apresentaram ação anti-câncer, dentre elas os terpenos (sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos), alcalóides, cumarinas, lignanas, flavonóides, taninos, stilbenos, curcuminóides, polissacarídeos (CAI et al, 2004). A atividade anti-tumoral de diversos extratos vegetais também tem sido extensivamente estudada apresentando resultados promissores (CAI et al., 2004; SEUNG et al., 2004; VOGT et al., 2005; WATASE et al., 2004; PEI-WEN et al., 2005).

Assim, diante do exposto, é notável a necessidade de se desenvolver novas estratégias mais eficientes para o tratamento de doenças inflamatórias e/ou no câncer. Assim, o presente estudo se justifica na busca por novos compostos que sejam alternativas no tratamento destas importantes enfermidades.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade, atividade anti-inflamatória e antitumoral dos extratos de *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera* e *Piper umbellatum*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade dos extratos de *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera* e *Piper umbellatum* em células não tumorais RAW 264.7 e selecionar as concentrações não citotóxicas.
- Avaliar o potencial anti-inflamatório das concentrações selecionadas dos extratos através da dosagem de óxido nítrico, TNF- α , e MCP-1 em células RAW 264.7 e selecionar o extrato mais promissor.
- Avaliar a influencia do extrato selecionado na produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10.
- Avaliar o efeito imunomodulador do extrato selecionado sobre a expressão de moléculas coestimuladoras CD40 e CD80 em células RAW264.7
- Avaliar a influência do extrato na proliferação de esplenócitos e na produção da citocina IFN- γ .
- Avaliar a ação do extrato selecionado *in vivo*, utilizando o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton.
- Avaliar a citotoxicidade e ação anti-inflamatória do composto majoritário do extrato selecionado.
- Avaliar o efeito dos extratos sob a viabilidade de células de carcinoma mamário murino (4T1) e melanoma murino (B16) *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos foram produzidos e fornecidos pelo professor Dr. Ademar Alves da Silva Filho, do Núcleo de Identificação e Isolamento de Princípios Ativos Naturais (Nippan) - Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As plantas foram coletadas no dia 19 de agosto de 2015 no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. As exsiccatas dos vegetais foram depositadas no Herbário Leopoldo Krieger – CESJ, da UFJF, sob números de tombo CESJ 48624 (*Piper umbellatum*), CESJ 64488 (*Solidago chilensis*) e CESJ 50054 (*Aristolochia cymbifera*).

Os materiais vegetais foram lavados com água corrente a fim de retirar a terra aderida, e, posteriormente levado à estufa a 45 °C para realização do processo de secagem por três dias.

Após secagem, os materiais vegetais foram triturados em moinho de facas, totalizando 100 g, para cada material vegetal. Em seguida, cada material vegetal obtido foi submetido à maceração com etanol: água (8:2 v/v) por duas semanas. Após filtração, a solução foi transferida para balões de fundo redondo e concentradas com auxílio de rotaevaporador à temperatura de 40 ± 5 °C fornecendo cerca de 8 g de cada extrato. Os extratos obtidos foram acondicionados em geladeira e ao abrigo da luz, sendo denominados de acordo com o quadro abaixo:

Extratos	Códigos
<i>Solidago chilensis</i> (Raiz)	G10
<i>Solidago chilensis</i> (Partes aéreas – lavado)	G11
<i>Solidago chilensis</i> (Partes aéreas – diclorometano)	G12
<i>Aristolochia cymbifera</i> (Raiz)	G13
<i>Piper umbellatum</i> (Raiz)	G14

Quadro 1: Denominação dos códigos utilizados para cada extrato

4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO G14 E ISOLAMENTO DO 4-NC

Com o intuito de realizar o isolamento dos seus constituintes químicos majoritários, o extrato G14 (8,5 g) foi submetido a cromatografia líquida à vácuo (CLV). Para isso, este extrato foi aplicado em uma coluna de vidro de 10 cm de diâmetro interno, contendo 380 g de sílica gel. A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano (Hex):acetato de etila (AcOEt) em gradiente de polaridade crescente, sendo o procedimento finalizado com metanol. Foram coletadas 9 frações de 1500 mL cada, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas de acordo com a similaridade de perfil químico, totalizando cinco frações (**Quadro 2**).

FASE MÓVEL	FRAÇÕES	MASSA
Hexano	G14-I	2,66 g
Hex:AcOEt (98:2)		
Hex:AcOEt (95:5)		
Hex:AcOEt (90:10)		
Hex:AcOEt (80:20)		
Hex:AcOEt (70:30)	G14-II	0,69 g
Hex:AcOEt (50:50)	G14-III	0,83 g
Acetato de Etila	G14-IV	0,94 g
Metanol	G14-V	1,89 g

Quadro 2. Frações obtidas por CLV do extrato G14

Para a continuidade dos processos cromatográficos, a fração G14-I foi selecionada, tendo em vista a sua quantidade e a pouca complexidade quanto aos constituintes. Desta forma, a fração G14-I (2,66 g) foi submetida a cromatografia em coluna flash (6 cm de diâmetro e 18,5 cm de altura), empacotada com sílica gel como fase estacionária. A fase móvel utilizada foi Hex:AcOEt em grau crescente de polaridade. Ao final, foram recolhidas 94 subfrações de 50 mL cada, as quais foram agrupadas posteriormente em 7 subfrações após análise em CCD (**Quadro 3**).

FASE MÓVEL	FRAÇÕES	MASSA
Hexano	G14-I-1 a 8	1,2 mg
Hex:AcOEt (99:1)	G14-I-9 a 17	9,0 mg
Hex:AcOEt (98:2)	G14-I-18 a 21	149,5 mg
Hex:AcOEt (97:3)	G14-I-22 a 26	79,1 mg
Hex:AcOEt (95:5)	G14-I-27 a 57	914,7 mg
Hex:AcOEt (90:10)	G14-I-58 a 77	412,3 mg
Acetato de Etila	G14-I-78 a 94	345,5 mg

Quadro 3. Frações obtidas por CLV do extrato PU-EB

Após a análise das frações em CCD, observou-se a presença de uma substância isolada presente na subfração G14-I-58 a 77, sendo esta subfração posteriormente analisada por espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio (RMN de ^1H) e carbono (RMN de ^{13}C), sendo então identificada como 4-nerolidilcatecol (4-NC). Em seguida, esta substância foi adicionalmente analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.3.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) do 4-NC

As análises dos perfis cromatográficos do 4-NC foram realizadas em cromatógrafo analítico Waters®, utilizando coluna analítica de fase reversa C_{18} (4,6 mm x 250mm, 5 μm). Como eluentes da fase móvel utilizou-se uma fase binária composta de A: água e 0,1% de ácido fosfórico e B: metanol com gradiente de polaridade da fase móvel de 40-100% de B em 40 minutos. O 4-NC foi solubilizado em metanol na concentração de 2mg/mL e filtrado em filtro de membrana de celulose de 0,45 μm , sendo uma alíquota de 30 μL injetada no cromatógrafo com fluxo de 1 mL/min. A detecção foi realizada em 211 nm. Após a análise, o grau de pureza da substância isolada calculado foi de 98,13% (**Figura 5**) e seu peso molecular é **dexxx**

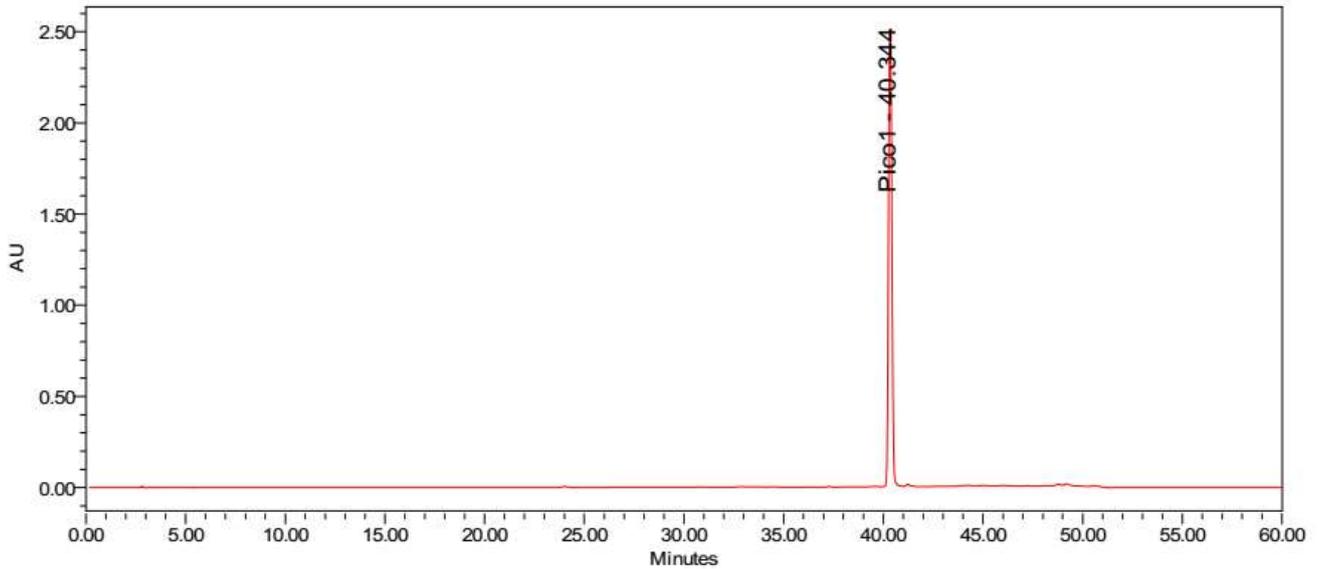


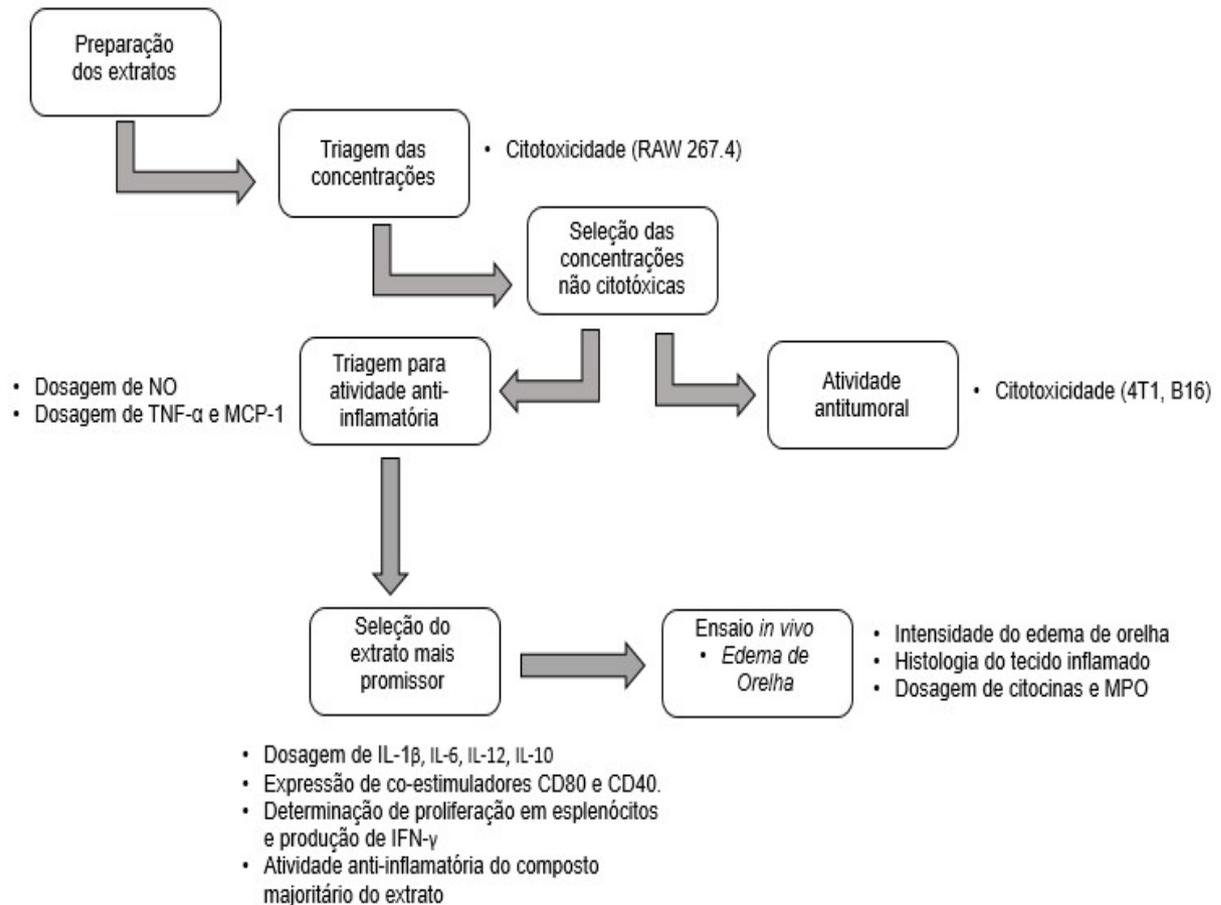
Figura 5. Cromatograma do 4-NC obtido em CLAE.

4.3 DILUIÇÃO DOS EXTRATOS E DO 4-NC

Os extratos e o 4-NC foram estocados em geladeira a 4°C. Para a realização dos ensaios, eles foram pesados e solubilizados em 100ul de dimetilsulfóxido (DMSO; Synth). Inicialmente, as concentrações utilizadas dos extratos foram de 100, 50 e 10ug/ml, enquanto as concentrações do 4-NC foram 40, 30, 20, 10 e 5µM e posteriormente as concentrações foram adaptadas de acordo com os resultados de citotoxicidade. A concentração máxima de DMSO por poço foi de 0,5%.

Para a diluição dos extratos e do 4-NC, foi feita uma solução estoque de concentração de 4mg/ml e 80µM, respectivamente, e, a partir delas, as outras concentrações desejadas foram preparadas.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



4.5 CULTURA DE CÉLULAS

Macrófagos das linhagens RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™), e células linhagens de carcinoma mamário 4T1 (ATCC® CRL-2539™) e melanoma murinos B16-F10 (ATCC® CRL-6475™), gentilmente cedidas pelas professoras Ana Paula Ferreira e Jacy Gameiro, do Laboratório de Imunologia e DIP, da UFJF, foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³ (SARSTEDT) com meio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO) e 1% de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina, SIGMA) e mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Os macrófagos da linhagem J774a.1 (ATCC® TIB-67™), gentilmente cedidos pelo professor Dr. Henrique Teixeira, do Laboratório de Imunologia/IMUNOCET, da UFJF, foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm³ (SARSTEDT) com meio

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – GIBCO), acrescido de 10% de SFB, 1% de antibiótico e cultivadas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO₂.

As células foram cultivadas até que atingissem confluência de aproximadamente 80%. A cada 2 ou 3 dias as garrafas eram lavadas com 10ml de PBS estéril para garantir a eliminação de células mortas e o meio repostado.

Uma vez atingida a confluência, as células foram novamente lavadas e 10ml de meio RPMI ou DMEM suplementados (2% de SFB e 1% de antibiótico) foram adicionadas. Em seguida as células foram raspadas utilizando suportes plásticos (cell scraper – 71 SARSTED). A solução contendo as células foi transferida para um falcon de 50ml, e centrifugado por 10min a 1500 rpm. Em relação as linhagens tumorais (4T1 e B16), a remoção foi realizada adicionando-se, após a lavagem, 5ml de tripsina – EDTA. Seguiu-se então uma incubação a 37°C por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 5ml de SFB, para inativar a tripsina. Essas soluções com as células foram transferidas para falcons de 50ml e centrifugadas por 5min a 1500 RPM.

Após a remoção, as células foram novamente lavadas e submetidas ao procedimento experimental. Alternativamente as células foram estocadas em nitrogênio líquido imersas em meio de congelamento (90% de Soro Fetal Bovino e 10% de Dimetilsulfoxio –DMSO - VETEC).

4.6 TESTE DE VIABILIDADE (MTT)

Para a determinação da citotoxicidade dos extratos, foi utilizado o método colorimétrico de MTT ((brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Este teste quantifica o quanto o sal MTT é reduzido por desidrogenases mitocondriais, formando cristais de formazan, de cor roxa. A viabilidade celular é diretamente proporcional a quantidade de cristais roxos (MOSMAN, 1983).

Assim, após as lavagens, como descrito acima (item 4.5), o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 2ml de meio RPMI suplementado com 2% de SFB e 1% de antibiótico. As células foram diluídas em PBS (480ul de PBS para 20ul da solução de células) e a esta solução foi adicionado 500ul do corante Azul de Trypan (Sigma) para contagem em câmara de Neubauer (fator de diluição de 50).

As células da linhagem RAW foram semeadas em placas de fundo chato de 96 poços, na concentração de 10⁵ células/poço (adaptado de HUO *et al.* 2012), enquanto

as linhagens 4T1 e B16 foram plaqueadas na concentração de 10^4 células/poço (adaptado de LAI et al., 2012). Todas as linhagens foram plaqueadas no volume de 100ul/poço.

Após o período de 24h de incubação, o meio de cultura foi retirado, para remoção de células mortas e foi adicionado 150ul de meio RPMI (2% de SFB e 1% de antibiótico) em cada poço e então foram plaqueadas as diferentes concentrações dos extratos em triplicata, no volume de 50ul, totalizando 200ul/poço. Todos os ensaios continham controles de DMSO (solvente) 0,5% e controles de meio RPMI (não tratados).

As placas foram então incubadas por 48h em estufa incubadora de 37°C e 5% de CO₂, e após esse período os sobrenadantes foram retirados e foi adicionado 10ul/poço de solução de MTT (5 mg.mL⁻¹, Invitrogen) diluído em 90ul de meio RPMI completo, para que fosse plaqueado um volume total de 100ul/poço. As placas foram novamente incubadas na estufa incubadora, por um período de 2 horas e 30 minutos (RISS et al., 2012). Após esse intervalo, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente para que os cristais de formazan fossem ressuspensos em 100ul de DMSO. A leitura foi feita em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) a 595 nm.

Os resultados obtidos das células tratadas com os extratos foram comparados com a absorbância dos controles não tratados, que foram considerados como 100% de viabilidade celular.

4.7 DOSAGEM DE NO EM CÉLULAS RAW 264.7

Para a dosagem de nitrito, como indicador da produção de Óxido Nítrico, as células foram cultivadas, plaqueadas em placas de 96 poços, e incubadas por 24h a temperatura de 37°C com 5% de CO₂, como já descrito. No dia seguinte, o meio foi trocado e as células foram estimuladas com LPS de *E. coli* (1 µg.mL⁻¹) (Sigma) + IFN- γ (20U.mL⁻¹) (Peprotech). Depois de 1 hora, os extratos em diferentes concentrações foram plaqueados e novamente as placas foram incubadas por 48h. Foram colocados além dos controles de DMSO e não tratado, um controle estimulado.

Ao final deste período, os sobrenadantes foram recolhidos para o doseamento de nitritos, por meio da Reação de Griess (GUEVARA et al., 1998).

Para isso, foram transferidos 50ul dos sobrenadantes das células estimuladas e tratadas, em triplicatas, em placas de 96 poços de fundo chato. Posteriormente, foi adicionado 25ul de 1% de sulfanilamida, um reagente diazo, e após 5 minutos, adicionou-se 25ul de 0,1% de naftiletilenodiamino-bicloridrato (NEED). Nesta reação, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido e o composto diazo formado reage com o NEED, gerando um composto de coloração rósea. (SUN et al., 2003). Após 5 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 540nm. As concentrações de nitrito das amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão, feita com a diluição seriada de uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) na concentração de $200\mu\text{M}$, em meio RPMI. As amostras foram então comparadas com os controles estimulados e não tratados.

4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS

Utilizou-se o sobrenadante das células estimuladas somente com LPS ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$) e tratadas com os extratos para a realização da dosagem das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 e IL-10 e da quimiocina MCP-1 (CCL2). Para a citocina IL-1 β , foi utilizado o sobrenadante de cultura de células J774A.1, enquanto para as demais citocinas, o sobrenadante de cultura de células RAW264.7 foi o mais adequado. No caso de esplenócitos, as células foram estimuladas com o mitógeno Concanavalina A e tratadas com o extrato, para a realização da dosagem da citocina IFN- γ . Para tanto, foi conduzido o ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduiche, de acordo com o protocolo do fabricante dos kits (Becton & Dickinson Company ou R&D Systems).

A absorbância das amostras foi medida a 450nm, no espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) e as concentrações das citocinas foram calculadas a partir de uma curva padrão, feita a partir da proteína recombinante purificada, específica de cada kit de citocina.

O ensaio foi feito em triplicata e os valores foram expressos em pg/ml, comparando-se as amostras tratadas com os controles estimulados não tratados.

4.9 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS

Para avaliar possíveis alterações na expressão das moléculas CD80 e CD40, células RAW 264.7 foram cultivadas e plaqueadas na concentração de 5×10^5 cél/poço em placas de 48 poços. Após 24 horas de incubação (37°C, 5% CO₂), as células foram estimuladas com LPS 1 µg/mL + IFN-γ 20 U/mL e tratadas com o extrato. Novamente foram incubadas por 24 horas (37°C, 5% CO₂) e o sobrenadante foi recolhido e adicionou-se 100 µl de tampão de FACS (PBS, SFB 1% e 0,09% de azida (NaNO₃) gelado em cada poço. Seguiu-se então uma vigorosa homogeneização (10 vezes) com a pipeta, de modo que as células se desprendessem do fundo da placa, sendo transferidos para placas de 96 poços fundo em “U”. Quando iniciou-se a marcação..

Primeiramente, as placas contendo as células foram centrifugadas a 4°C por 5 minutos, 1500 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido por inversão rápida da placa, e as células foram ressuspendidas no volume residual. Em seguida, foram adicionados 20 µL dos anticorpos (nas concentrações de 0,03 µg por poço, diluído em tampão de FACS). Os anticorpos utilizados foram anti-CD40 (BV421) e anti-CD80 (APC) (Becton & Dickinson).

Após 30 minutos de incubação a 4°C, 150 µL de tampão de FACS foram adicionados e as placas foram novamente centrifugadas e seus sobrenadantes descartados, sendo este procedimento repetido duas vezes. As células foram então ressuspendidas em 150 µL de tampão de FACS e essas suspensões foram transferidas para tubos de ensaio. No momento da leitura, foi adicionado 3 µl de iodeto de propideo, marcador que permite avaliar a viabilidade das células. A leitura foi realizada utilizando citômetro de fluxo FACScanto II (Becton Dickinson).

A estratégia utilizada para determinação dos fenótipos celulares, como demonstra a figura 3, consistiu inicialmente na retirada dos “doublets” (**Figura 6A**), seguida da determinação da zona de demarcação celular de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos das células alvo (**Figura 6B**). As células viáveis foram então determinadas a partir da utilização do corante de viabilidade (**Figura 6C**) e a média de intensidade de fluorescência (MIF) destas células foi determinada (**Figura 6D**). Para cada leitura foram adquiridos 30.000 eventos e os resultados foram analisados pelo software Flowjo.

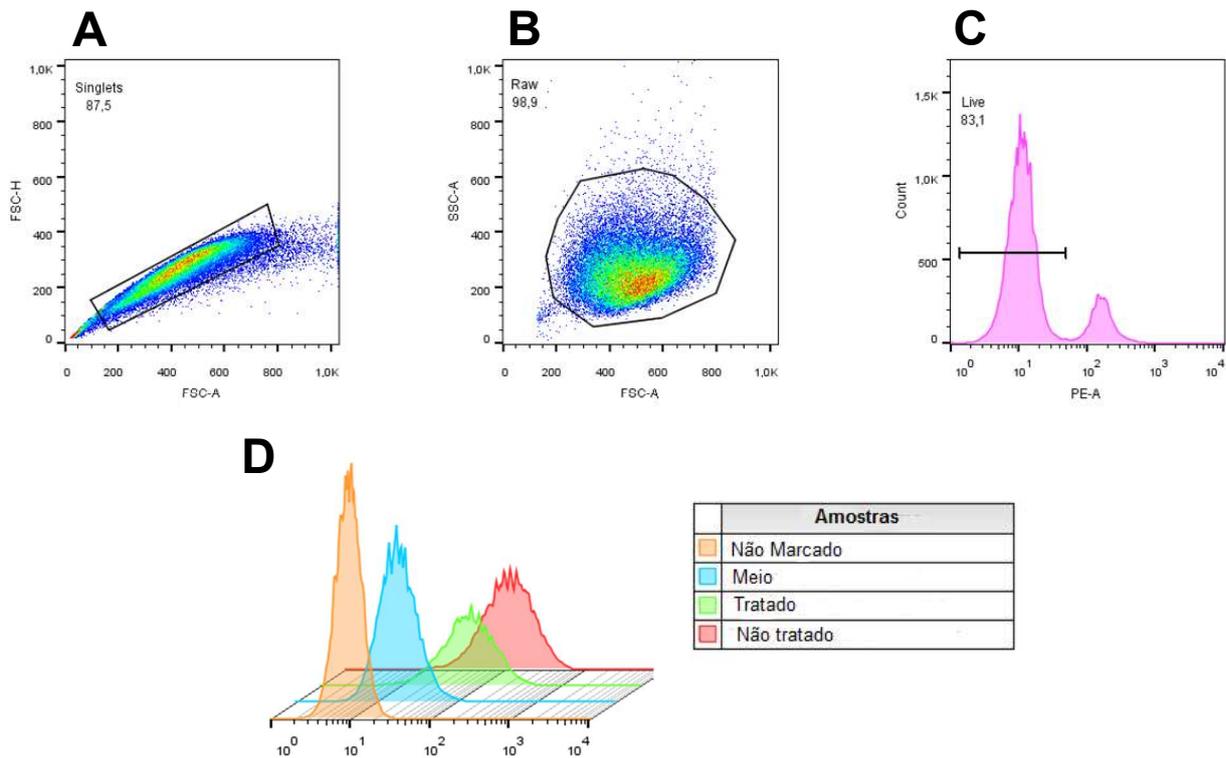


Figura 6: Estratégia de gate. (A) Retirada de dublets; (B) determinação da zona de demarcação celular de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos das células alvo; (C) determinação de células viáveis a partir da utilização do corante de viabilidade células; (D) média de intensidade de fluorescência (MIF).

4.10 ANIMAIS

Para os ensaios de proliferação de esplenócitos, foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6. Já para os ensaios de edema de pata, camundongos fêmeas BALB/c foram os mais adequados. Os animais de idade entre 8 e 10 semanas, provenientes do Centro da Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF), foram mantidos em temperatura padrão (22°C), ciclos de claro/escuro de 12 em 12 horas e com comida e água à vontade.

Os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Número de protocolo: 041/2016).

4.11 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR DE ESLENÓCITOS

Para a avaliação da influência do extrato G14 e do composto 4-NC no índice de proliferação de esplenócitos, estimulando linfócitos T, foi utilizada a técnica descrita por Sharma et al. (2007) com adaptações. Para isso, os baços de animais C57BL/6 foram extraídos e macerados em 10 mL de PBS utilizando-se peneiras de aço estéreis e, a seguir, centrifugados por 5 minutos a 600g, 4°C. O sobrenadante produzido foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão ACK (Ammonium-Chloride-Potassium - 1% KHCO₃ e 8% NH₄Cl em água destilada) por 5 minutos, em temperatura ambiente, no intuito de promover a lise osmótica dos eritrócitos. Ao término desta etapa, 28 ml de PBS foram acrescentados e seguiu-se nova centrifugação. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e os esplenócitos obtidos foram ressuspensos em 2 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico.

A concentração das células foi determinada na câmara de Neubauer utilizando-se o corante azul de tripan e plaqueadas na concentração de 10⁶ células por poço, em placas de 96 poços em fundo em "U". A seguir, foram adicionados o extrato G14 e o composto 4-NC em duas concentrações.

Para estimular a proliferação de linfócitos T, empregou-se como estímulo lectina Concanavalina A (5 mg.mL⁻¹, Sigma) na concentração de 5 µg.mL⁻¹ e após 2h, seguiu-se com a adição dos compostos e incubação por um período 48h, à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂.

Ao final da incubação, a proliferação celular foi determinada através do método do MTT, conforme descrito para células RAW 264.7. O índice de proliferação (IP) foi calculado dividindo-se os valores encontrados para as células estimuladas (ou estimuladas e tratadas) pelo valor encontrado no controle não estimulado.

4.12 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE ÓLEO DE CRÓTON

Para avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*, 20 animais BALB/C foram distribuídas em 4 grupos distinguidos pelo tratamento que receberam conforme descrito no **Quadro 4**.

Grupo	Intervenção
G1	Controle Positivo: Indução de inflamação Tratamento: veículo
G2	Controle Negativo: Indução de Inflamação Tratamento: Dexametazona (0,1mg/orelha)
G3	Indução de inflamação Tratamento: G14 (0,1mg/orelha)
G4	Indução de inflamação Tratamento: G14 (1mg/orelha)

Quadro 4: Organização dos grupos de animais para a avaliação *in vivo* da ação anti-inflamatória (edema de orelha) do extrato G14

O processo inflamatório agudo foi induzido pela aplicação tópica única do óleo de cróton (2,5% v/v em 20 µL de acetona) na superfície interna das orelhas direitas dos camundongos. Os compostos (0,1 e 0,5 mg/orelha) e a dexametazona (0,1 mg/orelha, controle positivo), foram administrados imediatamente após a aplicação do óleo de cróton por via tópica. Às orelhas esquerdas foram aplicadas somente o veículo (acetona) e foram utilizadas como controle negativo. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados e círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados e pesados individualmente utilizando uma balança analítica. A diferença de peso entre a orelha direita inflamada e a orelha esquerda não inflamada indicou a intensidade do edema.

Os círculos de 6mm obtidos das orelhas direitas foram seccionados ao meio com o auxílio de uma tesoura e armazenados a -80°C. Posteriormente uma parte foi utilizada na determinação dos níveis de mediadores inflamatórios e a outra na realização da análise histológica.

4.12.1 Determinação dos níveis de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e MCP-1)

A metade das orelhas direitas obtidas anteriormente foram homogeneizadas em 400uL de tampão de extração de citocinas de tecidos (NaCl 2.34%, Tween 20 0.05%, BSA 0.5%, PMSF 0.0017%, Cloreto de Benzetônio 0.00448%, EDTA 0.0372%, Aprotinina 0.002% em água destilada) e centrifugadas a 3000 RPM durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação dos

níveis das citocinas e da quimiocina pelo método de ELISA do tipo sanduíche, de acordo com o protocolo do fabricante (B&D Pharmingen, San Diego, CA, USA), conforme previamente descritos.

4.12.2 Avaliação da Atividade Enzimática da MPO

Os pellets/precipitados resultantes da centrifugação anterior foram utilizados para a avaliação da atividade enzimática da MPO. Para isso, eles foram ressuspensos em solução salina 0.2% gelada e homogeneizados. Após 15 segundos, foi adicionada uma segunda solução salina (NaCl 1.6% e glicose 5%) e eles foram novamente homogeneizados e, desta vez, centrifugados a 3000 RPM por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado em 75 uL de solução de HTAB 0.5%. Em seguida, a solução preparada anteriormente foi submetida ao congelamento com nitrogênio e descongelamento em temperatura ambiente por 3 vezes consecutivas e centrifugadas a 14000 RPM durante 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram plaqueados em placas de 96 poços de fundo chato e, a eles, foi adicionada uma solução tampão citrato (citrato 0.1M, H₂O₂ 0.04%, OPD 0.04%) na mesma proporção. Após 15 minutos, a absorbância foi lida em um leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices) a 490 nm e os resultados foram expressos em unidade de densidade ótica (DO) e comparados com o controle inflamado e não tratado (Veículo).

4.12.3 Análise histológica

Após serem fixadas em solução de formol a 10% por 24 horas, os fragmentos foram armazenados em álcool 70% até o início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, blocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 100x.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos dos ensaios foram analisados por meio do programa estatístico GraphPad Prism 5.00, utilizando-se o teste ANOVA seguido do pós-teste Dunnet para os ensaios *in vitro* e o teste ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls para ensaios *in vivo*. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS RAW TRATADAS COM OS EXTRATOS DE *S. chilensis*, *A. cymbífera* E *P. umbelattum*

Para determinar o potencial tóxico dos extratos de *S. chilensis*, *A. cymbífera* e *P. umbelattum*, células RAW 264.7 foram cultivadas e tratadas com as concentrações de 100, 50 e 10µg/ml para todos os extratos. Após 48 horas, a viabilidade foi determinada pelo método de MTT.

Considerando-se aceitável uma taxa de sobrevivência a partir de 80%, conforme sugerido por Gobec e colaboradores (2015), a concentração de 100µg/ml dos extratos G10 e G11 mostrou-se citotóxica para as células, sendo eliminada dos ensaios posteriores. O extrato G13 apresentou citotoxicidade também na concentração de 50µg/ml, enquanto o G14 foi tóxico em todas as concentrações testadas. Por outro lado, o extrato G12 não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 7**).

Como já mencionado no tópico 4.2, os extratos foram solubilizados em DMSO, e por isso, seu possível efeito tóxico sobre as células também foi avaliado. A concentração mais alta de DMSO utilizada nos ensaios foi de 0.5%, e como demonstrado na **Figura 1**, a taxa de sobrevivência das células tratadas somente com DMSO nesta concentração foi semelhante ao de células não tratadas, ou seja, em torno de 100%. Sendo assim foi descartado qualquer efeito tóxico apresentado pelo solvente.

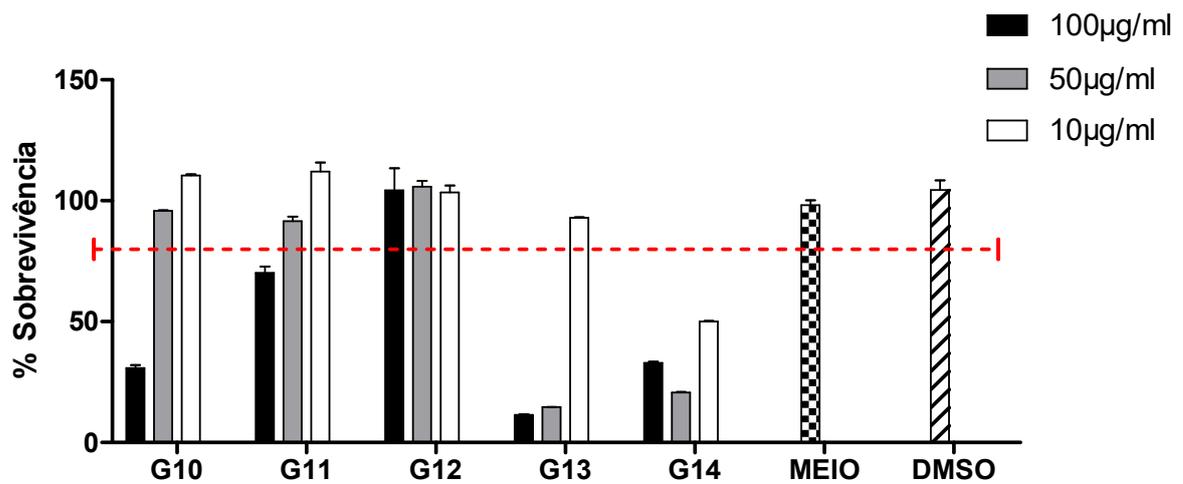


Figura 7: Avaliação da citotoxicidade de extratos de *S. chilensis*, *A. cymbifera* e *P. umbellatum*. Células RAW 264.7 (10^5 células/poço) foram incubadas com as concentrações de 100, 50 e 10 µg/ml dos extratos ou DMSO (0.5% no poço) por 48 horas. O percentual de sobrevivência foi determinado através do método colorimétrico do MTT. Foram consideradas com 100% de viabilidade as células que não sofreram nenhum tipo de tratamento. O DMSO não apresentou efeito tóxico na concentração utilizada.

Uma vez que os compostos G10 e G11 apresentaram toxicidade na concentração de 100 µg/ml, nos ensaios posteriores foram avaliadas as concentrações de 50, 25 e 10 µg/ml. Já para o extrato G13, as concentrações não tóxicas foram abaixo de 50 µg/ml, sendo selecionadas as concentrações de 10, 5 e 2,5 µg/ml. Em relação ao extrato G14, devido a sua elevada citotoxicidade, as concentrações foram reduzidas para 5, 2,5 e 1,25 µg/ml. Como mostra a **Figura 8**, as novas concentrações não exibiram toxicidade, sendo por isso adequadas para os ensaios posteriores.

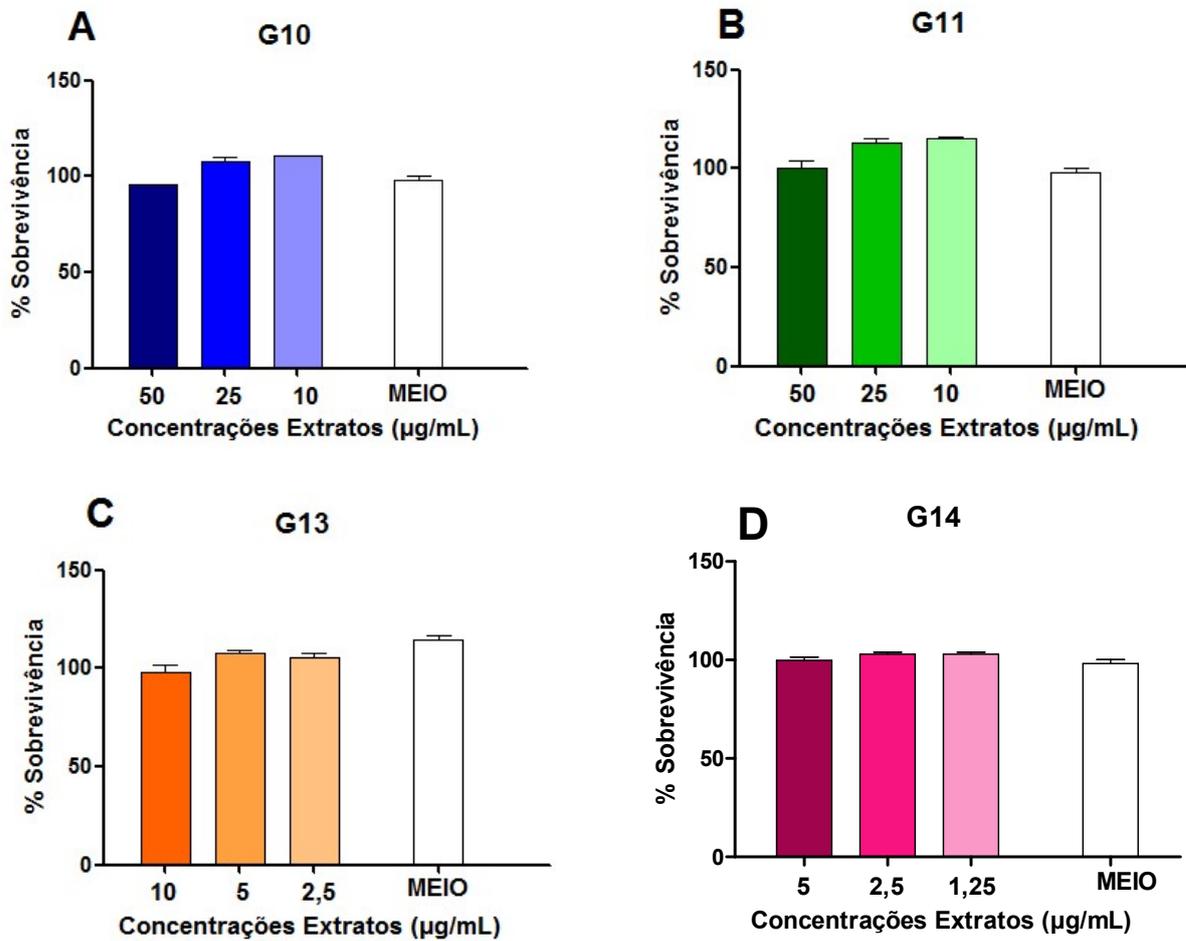


Figura 8: Avaliação da citotoxicidade dos extratos G10, G11, G13 e G14 nas novas concentrações selecionadas. Células RAW 264.7 (10^5 células/poço) foram incubadas com as concentrações de 50, 25 e $10\mu\text{g/ml}$ (G10 e G11), 10, 5 e $2,5\mu\text{g/ml}$ (G13) e 5, 2,5 e $1,25\mu\text{g/ml}$ (G14) dos extratos. Após 48 horas, o percentual de sobrevivência foi determinado através do MTT.

5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR CÉLULAS RAW 264.7 ESTIMULADAS E TRATADAS COM OS EXTRATOS DE *S. chilensis*, *A. cymbifera* E *P. umbellatum*

Um importante mediador inflamatório é o óxido nítrico, um radical livre de curta duração que possui propriedades pró-inflamatórias, agindo como vasodilatador, aumentando a permeabilidade vascular e estimulando a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (GUZIK et al., 2003). Além disso, participa de processos como a neurotransmissão e apoptose (NAGY et al., 2007), atuando também como um importante agente microbicida (GUZIK et al., 2003). Contudo, a produção exagerada deste mediador já foi associada a algumas doenças degenerativas, tais como doenças reumáticas, doenças inflamatórias, diabetes, choque séptico e isquemia cerebral (MOILANEN; VAPPATALO, 1995; DUSSE et al., 2003).

A produção de NO é estimulada na presença de citocinas pró-inflamatórias (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004). Uma das mais relevantes é o IFN- γ , uma citocina do perfil Th1 capaz de ativar macrófagos e conseqüentemente induzir a síntese de NO. Porém, essa indução é potencializada na presença de derivados microbianos, tal como o LPS (COX et al., 1992; CUNHA et al., 1993a). Essa associação (IFN- γ +LPS) foi utilizada neste ensaio, a fim de avaliar o potencial anti-inflamatório dos extratos em questão.

Para determinar se as concentrações não tóxicas dos extratos apresentam atividade sobre os mediadores inflamatórios, primeiramente avaliamos a produção de Óxido Nítrico em células RAW 264.7, estimuladas por uma hora com LPS e IFN- γ e em seguida tratadas com as diferentes concentrações de cada composto. Como demonstrado na **Figura 9**, os extratos G10 e G11 foram capazes de reduzir significativamente a produção de NO nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g/ml}$. O extrato G13 reduziu os níveis de óxido nítrico somente na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$. Além disso, o extrato G14 reduziu a produção deste mediador em suas duas maiores concentrações (5 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$). Em contrapartida, o extrato G12 não foi capaz de reduzir significativamente os níveis de NO em nenhuma das concentrações testadas.

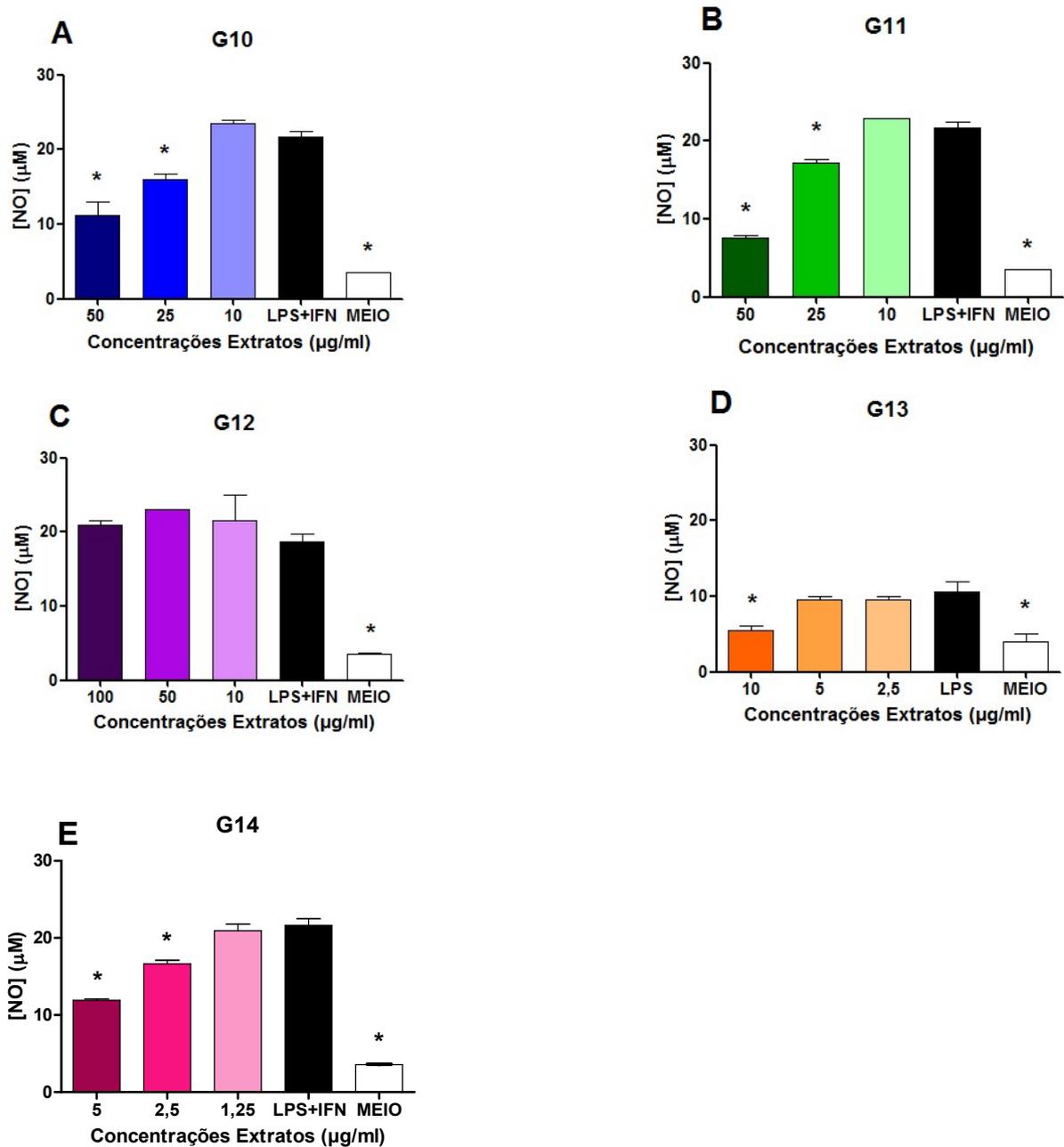


Figura 9: Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264.7 estimuladas e tratadas com os extratos de *S. chilensis*, *A. cymbifera* e *P.umbellatum*. Células RAW 264.7 foram plaqueadas (10^5 células/poço) e estimuladas com LPS ($1\mu\text{g/mL}$) e IFN- γ (20U/mL). Após 1 hora, estas células foram tratadas com os extratos G10 (A), G11 (B) e G12 (C) de *S. chilensis*, G13 (D) de *A. cymbifera* e G14 (E) de *P. umbellatum* em diferentes concentrações. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e os níveis de MCP-1 foram avaliados através do ELISA. As amostras foram comparadas com o controle estimulado (LPS). (*) $P < 0.05\%$ (ANOVA/Dunnet)

Visto que o extrato G12 não modificou a produção de NO, mas também não exibiu citotoxicidade nas concentrações testadas, foram realizados novos testes com concentrações maiores deste extrato com o intuito de potencializar a sua ação. Como demonstrado na **Figura 10A**, as concentrações de 250, 200 e 150µg/ml não apresentaram citotoxicidade mas somente a concentração de 250µg/ml foi capaz de reduzir os níveis de NO de maneira significativa (**Figura 10B**).

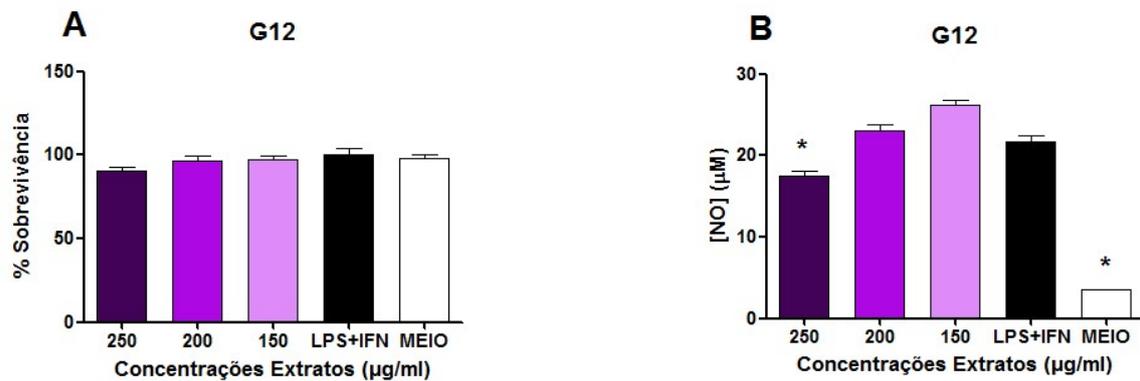


Figura 10: Avaliação da citotoxicidade e da produção de NO de concentrações mais elevadas do extrato G12. Células RAW 264.7 foram plaqueadas (10^5 células/poço), estimuladas com LPS ($1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e IFN- γ ($20\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 1 hora e tratadas com 250, 200 ou 150µg/ml do extrato G12. Após 48 horas, a viabilidade celular foi determinada por MTT (A) e o sobrenadante foi utilizado para a avaliação da produção de NO (B), através da reação de Griess. (*) $P < 0.05\%$ em relação ao controle estimulado (LPS+IFN- γ) (ANOVA/Dunnet).

Considerando-se os resultados das análises acima, foi resumida no **Quadro 5** as concentrações de cada extrato selecionadas para os subsequentes ensaios.

Extratos	Concentrações (µg/ml)
G10	50 - 25 - 10
G11	50 - 25 - 10
G12	250 - 200 - 150
G13	10 - 5 - 2,5
G14	5 - 2,5- 1,25

Quadro 5: Concentrações selecionadas para cada extrato

5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA CITOCINA TNF- α E QUIMIOCINA MCP-1 POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS EXTRATOS DE *S. chilensis*, *A. cymbifera* E *P. umbellatum*

Uma vez que os extratos foram capazes de induzir uma redução significativa na produção de NO, também foi avaliado sua ação sobre a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α , e da quimiocina (MCP-1). Cabe destacar que tais mediadores foram selecionados visto que possuem extrema importância no curso da inflamação, além de estarem envolvidos em diversas patologias de caráter inflamatório. O TNF- α , provoca alterações endoteliais e ainda estimula liberação de quimiocinas que ajudam no recrutamento de leucócitos, além de apresentar importante papel na proliferação celular e em processos apoptóticos (BRADLEY,2008). A MCP-1, por sua vez, é uma quimiocina que atua no recrutamento de monócitos sanguíneos para o sítio inflamatório bem como na ativação destas células, sendo por isso importante fator pró-inflamatório. Além disso, esta quimiocina é um importante mediador presente em doenças que envolvem infiltração de células mononucleares, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso. (DALY & ROLLINS, 2003)

Apesar de todos os extratos serem capazes de reduzir a produção de NO, somente o composto G14 foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- α nas concentrações de 5 e 2,5µg/ml, enquanto os demais extratos não alteraram significativamente a produção desta citocina. Além disso, de maneira contraditória, o composto G11 estimulou a produção de TNF- α em sua menor concentração (10µg/ml) (**Figura 11**).

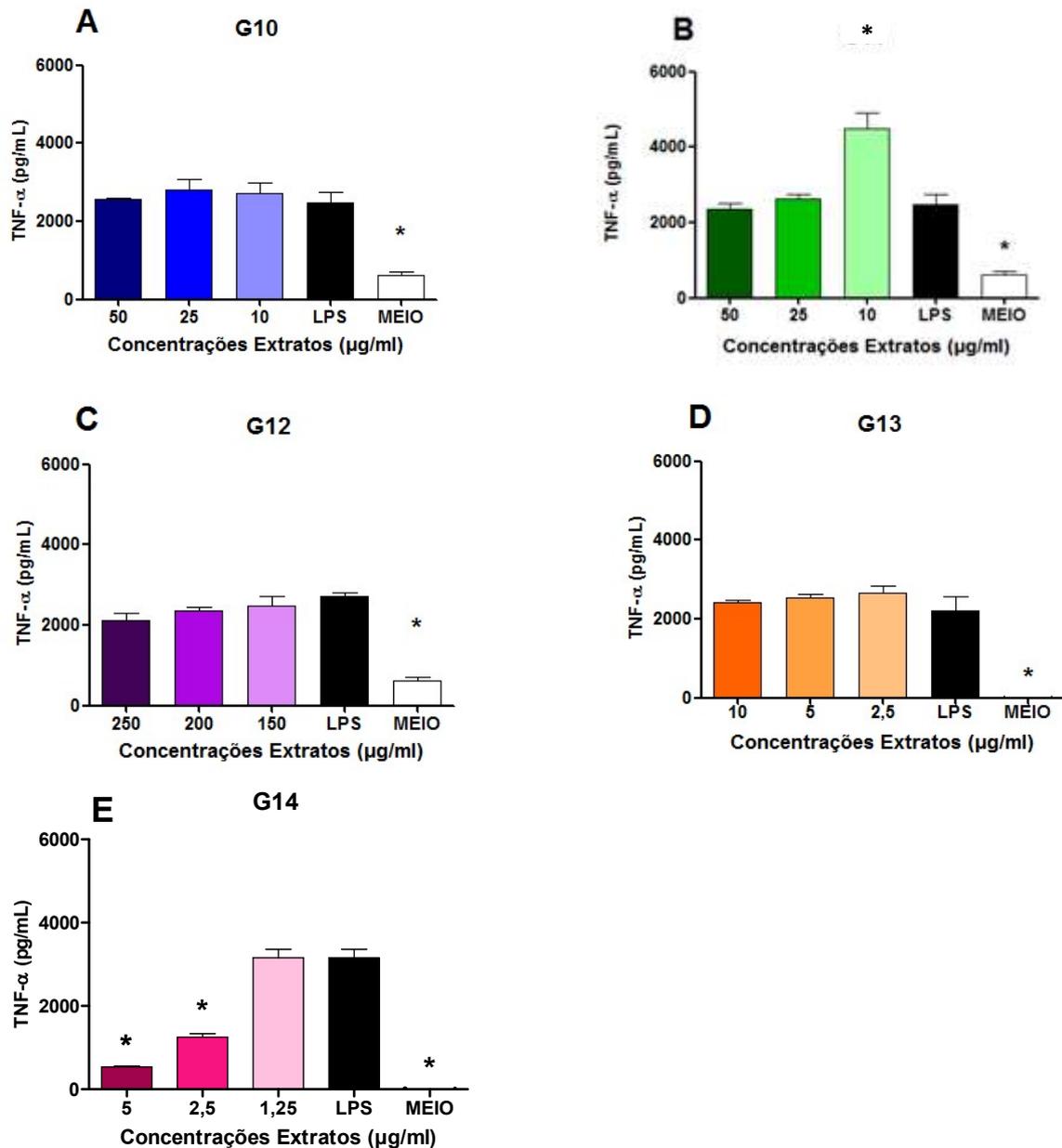


Figura 11: Avaliação da produção da quimiocina TNF- α por células RAW 267.4 tratadas com os extratos. Células RAW 264.7 foram plaqueadas (10^5 células/poço), e estimuladas com LPS ($1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 1 hora. Em seguida foram tratadas com os extratos G10 (A), G11 (B) e G12 (C) de *S. chilensis*, G13 (D) de *A. cymbifera* e G14 (E) de *P. umbellatum* em diferentes concentrações. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e os níveis de TNF- α foram avaliados através do ELISA. As amostras foram comparadas com o controle estimulado (LPS). (*) $P < 0.05\%$ (ANOVA/Dunnet)

Assim, uma vez que os extratos têm apresentado características anti-inflamatórias, avaliamos sua influência na produção desta quimiocina. Conforme demonstrado na **Figura 12**, com exceção do G12, todos os extratos foram efetivos em reduzir a produção de MCP-1 quando utilizados em sua maior concentração. Com destaque, mais uma vez, temos o G14, capaz de reduzir a produção desta quimiocina em suas duas maiores concentrações.

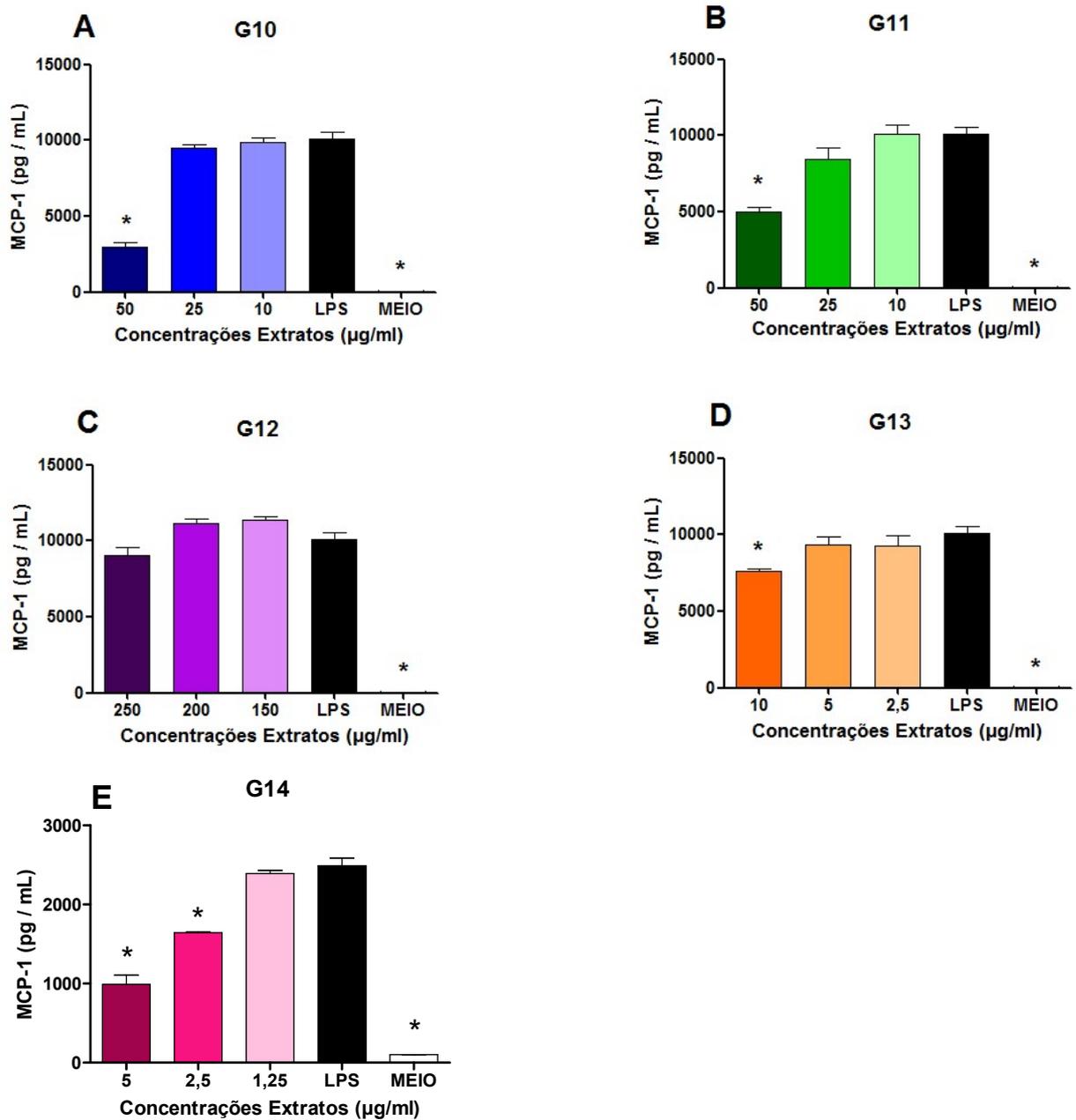


Figura 12: Avaliação da produção da quimiocina MCP-1 por células RAW 267.4 tratadas com os extratos. Células RAW 264.7 foram plaqueadas (10^5 células/poço), e estimuladas com LPS ($1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 1 hora. Em seguida foram tratadas com os extratos G10 (A), G11 (B) e G12 (C) de *S. chilensis*, G13 (D) de *A. cymbifera* e G14 (E) de *P. umbellatum* em diferentes concentrações. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e os níveis de MCP-1 foram avaliados através do ELISA. As amostras foram comparadas com o controle estimulado (LPS). (*) $P < 0.05\%$ (ANOVA/Dunnet)

Visto que entre os extratos testados, o G14 foi o mais promissor, sendo o único capaz de atuar na redução dos três mediadores inflamatórios avaliados (NO, TNF- α e MCP-1), selecionamos este composto em suas duas maiores e mais eficazes concentrações (5 e 2,5 μ g/ml) para a avaliação de outras citocinas e moléculas importantes no processo inflamatório. Os demais extratos foram então eliminados dos próximos ensaios de cunho inflamatório, uma vez que não foram tão promissores quanto o extrato G14.

5.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO G14 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10.

Outra citocina de destaque no processo inflamatório é a IL-1 β , produzida inicialmente em sua forma inativa, a proIL-1 β , que é ativada através da cascata de caspase-1, que por sua vez necessita da proteína adaptadora ASC. (WATANABE e KOBAYASHI, 1994). Segundo estudo realizado por Pelegrin e colaboradores (2008), macrófagos da linhagem RAW264.7 não expressam a proteína ASC, permitindo somente a produção da forma inativa proIL-1 β . Por este motivo, para avaliar a influência do extrato na produção de IL-1 β , foi utilizada a linhagem de macrófagos, a J774a.1 que, neste mesmo estudo de Pelegrin mostrou-se efetiva na produção da forma ativa de IL-1 β . Conforme exibido na **Figura 13A** os resultados nos mostram que o extrato G14 foi capaz de reduzir em aproximadamente 7 vezes a produção desta citocina em sua maior concentração e em aproximadamente 3 vezes em sua menor concentração, demonstrando mais uma vez seu grande potencial anti-inflamatório.

Quanto a citocina IL-6, o extrato G14 foi capaz de reduzir aproximadamente três vezes sua produção em ambas concentrações analisadas (**Figura 13B**) Cabe destacar que além desta citocina estimular a produção de proteínas de fase aguda, ela também atua na diferenciação de linfócitos B, na proliferação de linfócitos T, na secreção de imunoglobulinas, além de ativar a cascata do complemento (LOTZ *et al.* 1988, EBERSOLE e CAPELLI 2000).

O extrato G14 foi capaz de reduzir a produção de IL-12 em suas duas concentrações testadas (**Figura 13C**), demonstrando seu potencial em modular uma resposta Th1 mesmo quando utilizado em concentrações baixas, chegando a níveis semelhantes ao controle não estimulado. A interleucina 12 atua na geração de outras citocinas pró-inflamatórias (como IFN- γ e TNF- α) e é capaz de direcionar o desenvolvimento da resposta celular Th1 (GOODRIDGE et al., 2003).

Uma vez que os extratos foram capazes de inibir a produção de mediadores inflamatórios, foi investigado se esta inibição estava relacionada a produção da citocina IL-10, uma citocina de efeitos pleiotrópicos na inflamação e na imunorregulação (MOORE et al., 1993), que interfere negativamente na produção de mediadores pró-inflamatórios, podendo minimizar as patologias que são desencadeadas por este processo (O'GARRA et al., 2004).

O extrato G14 não apresentou influência significativa na produção desta citocina, como demonstrado na **Figura 13D**. Este resultado sugere que o efeito apresentado por este extrato ocorre na via de produção dos mediadores e não indiretamente através da produção da citocina IL-10.

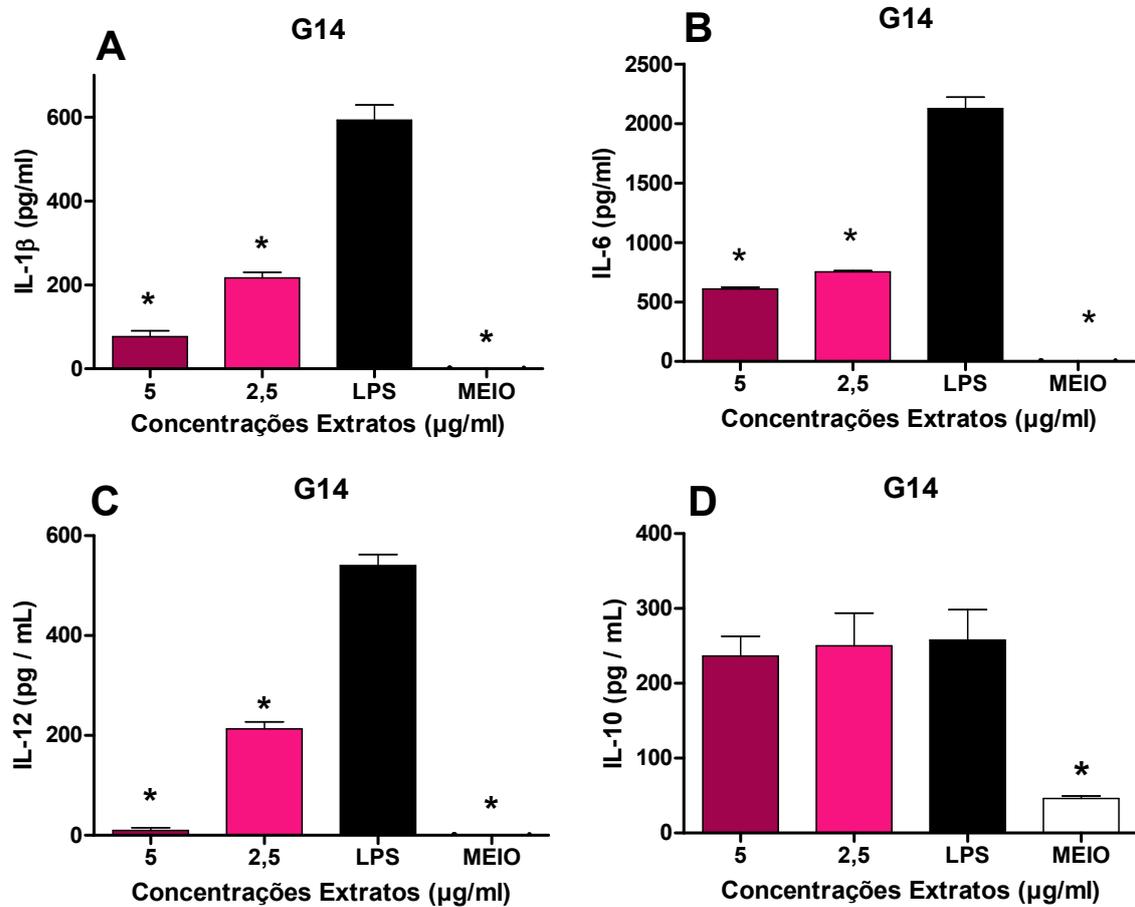


Figura 13: Avaliação da produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, e IL-10 por células tratadas com o extrato G14 e estimuladas com LPS. Células J77a.1 e RAW 264.7 foram plaqueadas (10^5 células/poço), e estimuladas com LPS ($1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 1 hora. Em seguida foram tratadas com as concentrações de 5 e $2,5\mu\text{g}/\text{ml}$. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e os níveis de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-12 (C) e IL-10 (D) foram avaliados através do ELISA. As amostras foram comparadas com o controle estimulado (LPS). (*) $P < 0.05\%$ (ANOVA/Dunnet)

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COESTIMULADORES (CD40 E CD80) EM CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM O EXTRATO G14

Além da produção de citocinas e NO, é necessário a interação célula-célula envolvendo inúmeros sinais, para que a imunidade adaptativa seja desencadeada, através da ação de linfócitos, e assim, ocorra uma resposta imune efetiva. Dentre eles, os “sinais secundários” ou coestimuladores são essenciais para a ativação e proliferação de linfócitos e conseqüentemente uma potencialização da resposta. (GREWAL e FLAVELL, 1996). Nesse contexto, os macrófagos são importantes APCs, que além de processarem e apresentarem os antígenos via moléculas de MHC, também fornecem o segundo sinal de ativação, através da expressão destas moléculas coestimuladoras, como CD40, CD80 e CD86 (COQUET, RAUSCH, BORST, 2015).

As moléculas CD80 e CD86 também possuem papel fundamental na ligação da imunidade inata com a imunidade adaptativa, uma vez que são reconhecidas por meio do receptor CD28, expresso na superfície dos linfócitos T. Esta ligação é capaz de promover a proliferação e diferenciação de células T (ALEGRE, FRAUWIRTH E THOMPSON, 2001) e conseqüentemente maior produção de citocinas (LINDSTEIN, et al., 1989), além de induzir a expressão de proteínas antiapoptóticas, como a BCL-XL (BOISE et al., 1993).

Desta forma, diante dos resultados apresentados pelo extrato G14, o qual foi capaz de reduzir mediadores inflamatórios como NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β e MCP-1, também foi avaliado a influência deste composto na expressão das moléculas coestimuladoras CD40 e CD80, pelo ensaio de citometria de fluxo.

Conforme representado na figura, o tratamento com o G14 foi capaz de reduzir significativamente a expressão de CD40. Por outro lado, a expressão de CD80 foi reduzida de maneira muito sutil, porém estatisticamente significativa (**Figura 14**).

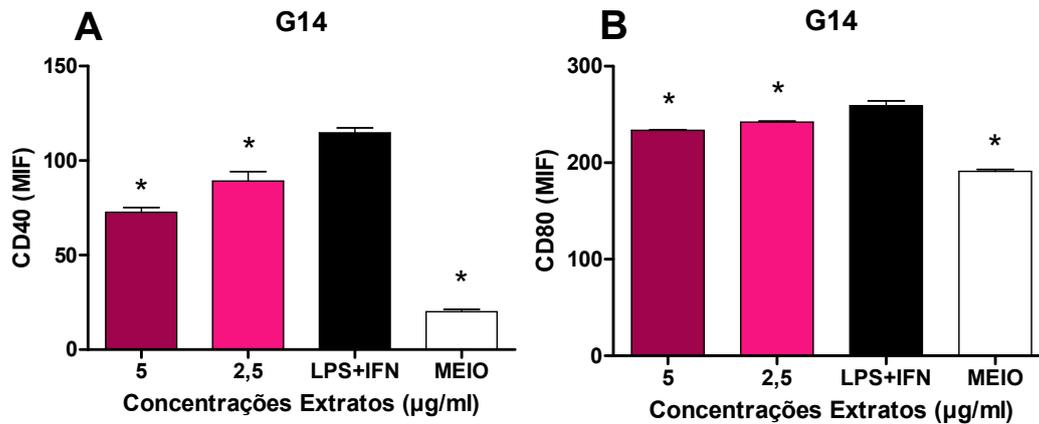


Figura 14: Efeitos do tratamento com o extrato G14 na expressão de moléculas co-estimuladoras. Células RAW264.7 foram estimulados com LPS+IFN- γ e tratados com as concentrações de 5 e 2,5µg/ml do extrato. Após 24h de incubação foi determinada, a expressão de (A) CD40 e (B) CD80 por citometria de fluxo, Os dados foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF). (*) $P < 0.05\%$ em relação ao grupo LPS+IFN- γ (ANOVA/Dunnet).

5.6 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN- γ POR ESLENÓCITOS TRATADOS COM O EXTRATO G14

Uma vez que o extrato G14 foi capaz de reduzir a produção de citocinas e de moléculas coestimuladoras em células da imunidade inata, sua influência em células da imunidade adaptativa também foi investigada. Para este objetivo, esplenócitos foram extraídos de camundongos C57BL/6, estimulados com concanavalina A (mitógeno de células T) e tratados com o extrato G14 em suas duas concentrações. Após 72 horas, o índice de proliferação foi determinado.

A **Figura 15** mostra que o extrato G14 foi eficaz na inibição de proliferação de linfócitos em ambas as concentrações avaliadas, embora a concentração de 5µg/ml tenha sido mais efetiva. Estes resultados sugerem que o extrato G14 também apresenta uma ação moduladora sobre a resposta imune adquirida.

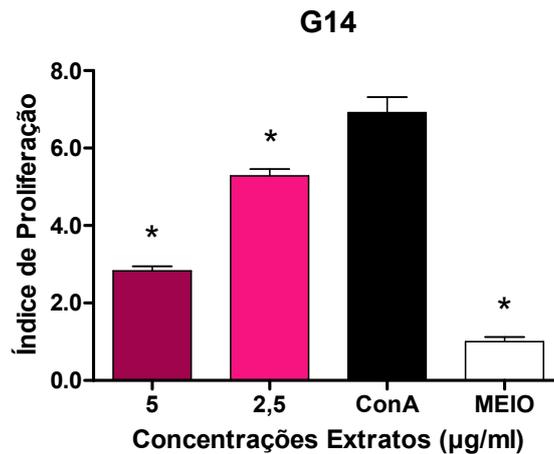


Figura 15: Influência do extrato G14 na proliferação de células T. Esplenócitos de camundongos C57BL/6 (10^6 células por poço) foram cultivados na presença do estímulo ConA ($5\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B) por 2 horas. Em seguida, as células foram tratadas com o extrato nas concentrações de 5 e $2,5\mu\text{g/ml}$. Após 48 horas de incubação o índice de proliferação celular foi avaliado pelo método de MTT. Como controles foram utilizadas células estimuladas e não tratadas, bem como células não estimuladas e não tratadas. O índice de proliferação foi calculado levando-se em conta a metabolização do MTT de células estimuladas e células não estimuladas. (*) $P < 0.05\%$ em comparação com ConA. (ANOVA/Dunnet).

Além da inibição de proliferação, foi avaliada a produção da citocina $\text{IFN-}\gamma$. Esta é uma citocina próinflamatória (PANDIYAN, et al., 2007), produzida em altos níveis em culturas de esplenócitos estimulados com Concanavalina A (CANDOLFI, et al., 1994). O $\text{IFN-}\gamma$ é produzido por linfócitos do perfil Th1 e inibe a proliferação de células que sintetizam as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Além disso, aumenta a expressão de moléculas de MHC de classes I e II (DE MAEYER e DE MAEYER-GUINARD, 1992) e ainda é responsável pela ativação de macrófagos (SCHOENBORN E WILSON, 2007). Consistente com a redução na proliferação, a **Figura 16** demonstra uma redução proeminente na produção de $\text{IFN-}\gamma$, após o tratamento com o extrato G14 em ambas as concentrações avaliadas, sugerindo mais uma vez uma ação deste composto sobre as células da imunidade adquirida.

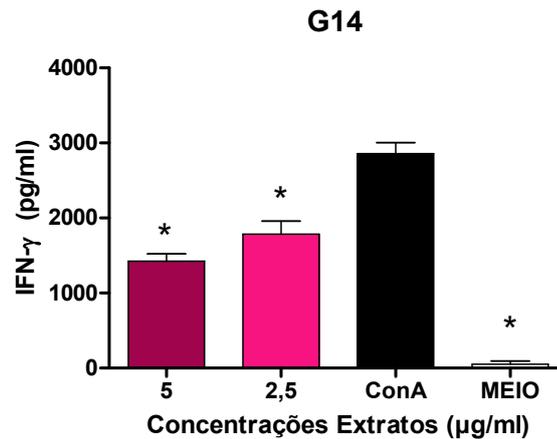


Figura 16: Avaliação da produção da citocina IFN- γ por esplenócitos com o extrato de *P. umbellatum*. Esplenócitos de camundongos C57BL/6 (10^6 células por poço) foram cultivados na presença do estímulo ConA ($5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (B) por 2 horas. Em seguida, as células foram tratadas com o extrato nas concentrações de 5 e $2,5\mu\text{g}/\text{ml}$. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e os níveis de IFN- γ foram avaliados através do ELISA. As amostras foram comparadas com o controle estimulado (LPS). (*) $P < 0.05\%$ (ANOVA/Dunnet)

5.7 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE RAÍZES DE *P. umbellatum* (G14) NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA

Visto que o extrato G14 apresentou boa eficiência na redução dos diversos mediadores inflamatórios avaliados, o presente estudo também determinou sua ação *in vivo* em um modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (PINTO et al., 2015). O óleo de cróton, que apresenta o 12-o-tetracanoilphorbol-13-acetato (TPA) como componente majoritário, é um ativador da proteína quinase C (PKC) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Tais proteínas estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (como IL- 1β e IL-6), fosfolipase A₂, fator ativador de plaquetas (PAF) e ácido aracdônico (AA), através da ativação de fatores de transcrição, como AP-1 e NF- κ B. Estes mecanismos geram uma resposta inflamatória, onde ocorre aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, migração leucocitária, edema, entre outros fatores (PASCUALI e GLASS, 2006; SARAIVA et al., 2011).

Assim, para determinar a ação do extrato G14 *in vivo*, um processo inflamatório foi induzido na orelha direita de camundongos BALB/c, utilizando óleo de cróton. Em seguida, esta orelha foi tratada topicamente com o extrato G14 nas concentrações de

0,1 ou 1mg/orelha, conforme sugerido por Pinto e colaboradores (2015). Após 4 horas, o edema foi avaliado através da diferença de peso entre a orelha inflamada e a orelha normal.

Conforme esperado, em animais não tratados, a aplicação do óleo de Cróton induziu um edema considerável, evidenciado pela grande diferença de peso entre as orelhas (cerca de 8,7mg). Ainda dentro do esperado, o tratamento com dexametasona foi eficiente em conter o edema, reduzindo, quase que totalmente, a diferença entre as orelhas (aproximadamente 90% de redução). Em relação ao extrato G14, em concordância com os dados obtidos *in vitro*, o tratamento também foi efetivo em reduzir o edema auricular em ambas as concentrações avaliadas. Esta redução foi de aproximadamente 30% quando G14 foi utilizado na menor concentração (0,1mg/orelha) e de aproximadamente 70%, quando G14 foi utilizado na maior concentração (1mg/orelha) (**Figura 17**).

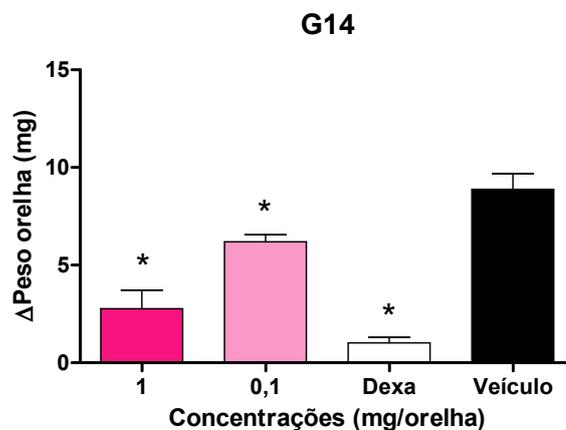


Figura 17: Efeito do extrato G14 em edema de orelha em camundongos C57BL/6, induzido por óleo de cróton. Uma solução de óleo de cróton a 2,5% foi aplicada topicamente nas orelhas direitas dos camundongos e em seguida, houve a aplicação do extrato G14. Dexametazona foi utilizada como droga de referência na concentração de 0,1mg/orelha para controle positivo. Acetona foi utilizada como controle negativo. Após 4 horas, as orelhas direita e esquerda foram retiradas e pesadas e a diferença entre os pesos foi analisada. (*) $P < 0.05\%$ em relação ao grupo de veículo. (ANOVA/Newman-Keuls).

A análise histológica do tecido auricular enfatiza os resultados descritos acima. Conforme demonstrado na **Figura 18**, comparado ao grupo controle, é possível perceber um intenso infiltrado inflamatório presente no tecido inflamado e não tratado (**Figura 18A**), diferente do que acontece com o tecido não inflamado (**Figura 18B**). Este infiltrado apresenta-se extremamente reduzido quando o tecido foi tratado com Dexametasona (**Figura 18C**) ou com as duas concentrações do extrato G14 (**Figuras 18C e 18D**).

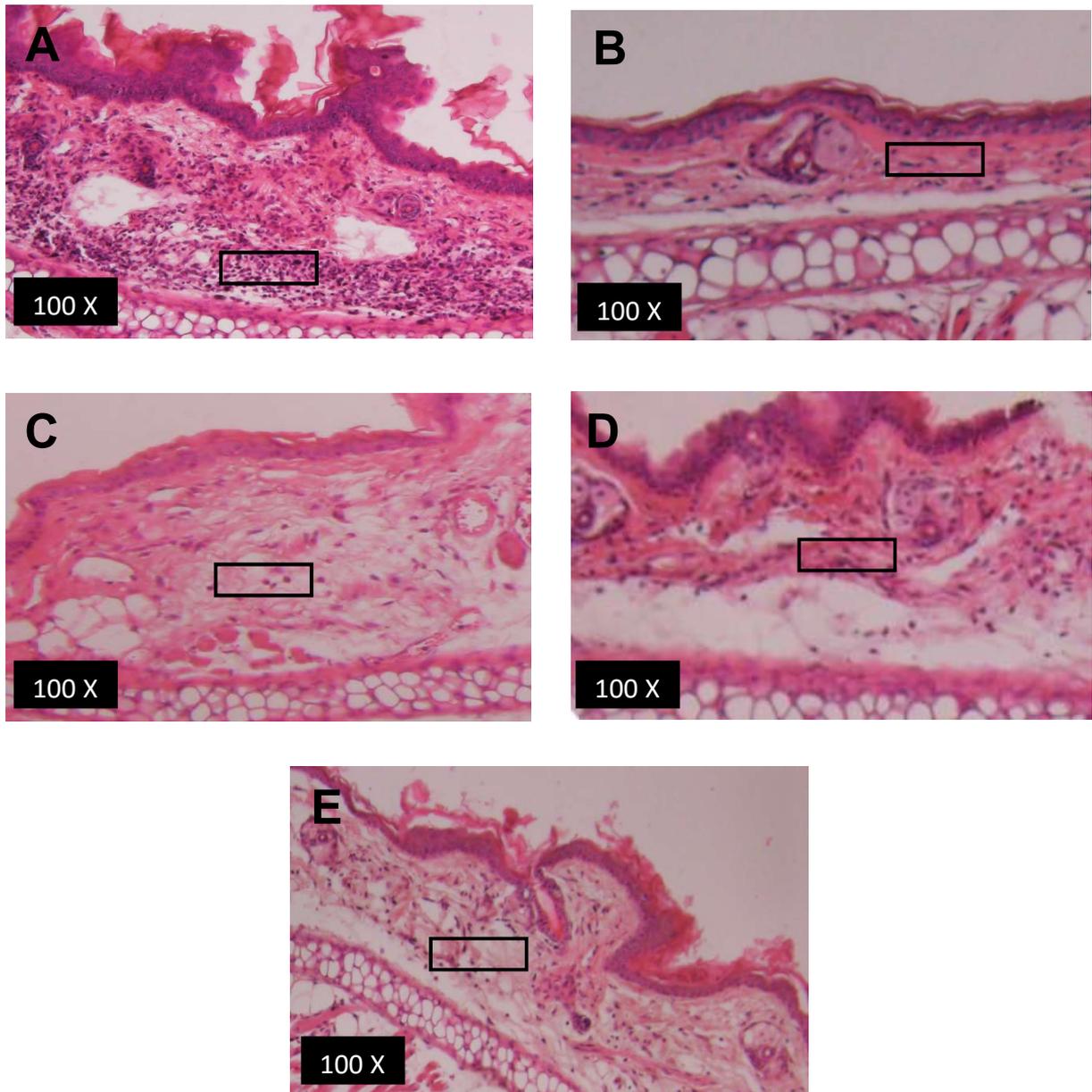


Figura 18: Efeitos do tratamento com o extrato G14 em tecido auricular inflamado. Fotomicrografias representativas de cortes transversais de orelhas obtidas após indução de inflamação por óleo de cróton, com coloração HE; aumento de 100x. (A) Veículo; (B) Não inflamado; (C) Dexametazona 0,1mg/orelha; (D) Extrato G14 0,1mg/orelha; (E) Extrato G14 1mg/orelha. Os retângulos indicam a intensidade de células inflamatórias.

Uma vez determinada a influencia do extrato na redução do edema, avaliou-se também a produção de mediadores inflamatórios no tecido auricular.

Como demonstrado nos gráficos da **Figura 19**, a concentração de 1mg/orelha do extrato G14 foi efetiva em reduzir a produção das citocinas IL-1 β e IL-6 assim como da quimiocina MCP-1. Essa redução se mostrou mais proeminente em relação a citocina IL-6, se assemelhando aos níveis encontrados após tratamento com a dexametazona. De forma contraditória, o tratamento com 0.1mg/ml do extrato G14 não induziu uma redução significativa na produção de nenhuma das citocinas avaliadas, mesmo sendo eficaz na redução do edema, como mostrado na **Figura 17**.

Além das citocinas e quimiocinas, a concentração da enzima mieloperoxidase também foi determinada no tecido inflamado. A mieloperoxidase é uma enzima encontrada principalmente em neutrófilos e monócitos e é o principal constituinte dos grânulos azurófilos de neutrófilos (Roman et al. 2008). Esta enzima é liberada após a ativação de neutrófilos, contribuindo para a resposta imune inata do organismo (Hansson, Olsson e Nauseef, 2006). Ela exerce papel muito importante na inflamação, pois além de atuar como sinalizadora de moléculas de adesão e funcionar como sinal de sobrevivência para neutrófilos, a MPO forma radicais livres e substâncias oxidantes, pela reação com peróxido de hidrogênio, o que pode promover um dano oxidativo ao tecido (NICHOLLS e HAZEN, 2006; ZHANG et al., 2002).

Conforme demonstrado na **Figura 19D**, o extrato G14 também foi capaz de reduzir a produção deste mediador, em ambas as concentrações avaliadas. Além disso, a redução de MPO induzida pelo extrato ocorreu de maneira semelhante aquela induzida pela droga de referência (dexametazona). Assim, os resultados apresentados até aqui demonstram claramente o grande potencial anti-inflamatório do extrato G14 tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

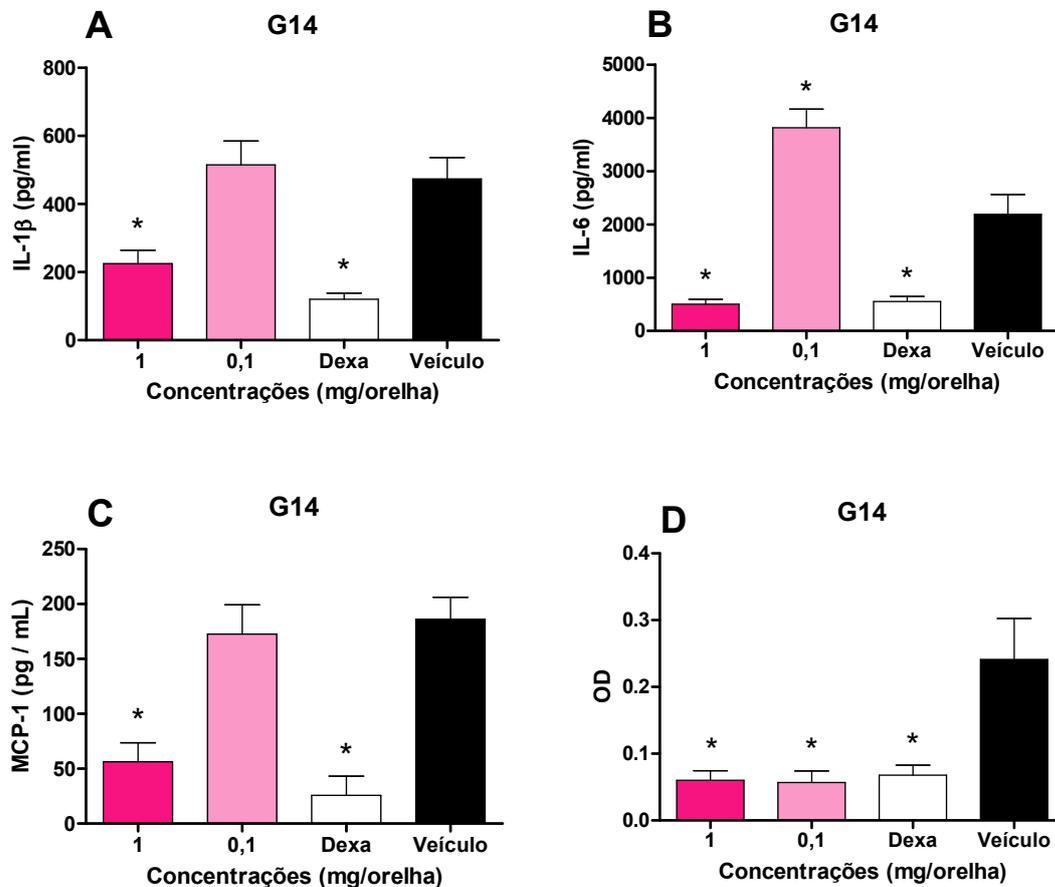


Figura 19: Efeito do extrato G14 na produção de citocinas e mieloperoxidase a partir de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Amostras das orelhas tratadas com o extrato G14 nas concentrações de 1,0 e 0,1mg/orelha, e dexametazona na concentração de 0,1mg/orelha foram coletadas após 4h da indução de edema com óleo de cróton para avaliação da produção de (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) MCP-1 e (D) MPO. O efeito sobre a enzima MPO foi expresso por densidade ótica (OD). A acetona foi utilizada como veículo. (*) $P < 0.05\%$ (ANOVA/ Newman-Keuls)

5.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO COMPOSTO ISOLADO 4-NEROLIDILCATECOL NA CITOTOXICIDADE E NA PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

O composto 4-nerolidilcatecol é um metabólito secundário mais abundante na espécie *Piper umbellatum*, sendo encontrado em raízes, folhas e inflorescências desta espécie (LIMA et al., 2013). Estudos prévios já demonstraram uma potente atividade antioxidante deste composto quando comparado ao α -tocoferol (Vitamina E)

(BARROS et al., 1996; DESMARCHELIER et al., 1997). Além disso, o 4-NC também mostrou ser capaz de exercer atividade protetora tópica contra danos da pele causados por radiação UVB (ROPKE et al., 2003).

Assim, tendo em vista a ótima atividade do extrato G14 diante das respostas inflamatórias, a ação do composto majoritário 4-NC também foi determinada neste estudo.

Para estes ensaios, primeiramente foram selecionadas as concentrações não-tóxicas, através do ensaio de viabilidade celular (MTT), como já descrito anteriormente. Novamente, foi adotada uma taxa de sobrevivência aceitável de 80% (GOBEC, et al, 2015). Os resultados apresentados na **Figura 20** demonstram que o composto 4-NC possui uma elevada citotoxicidade, em comparação ao extrato G14, apresentando citotoxicidade aceitável somente na concentração de 10 μ M ou inferior. Sendo assim, foram selecionadas as concentrações de 10 e 5 μ M.

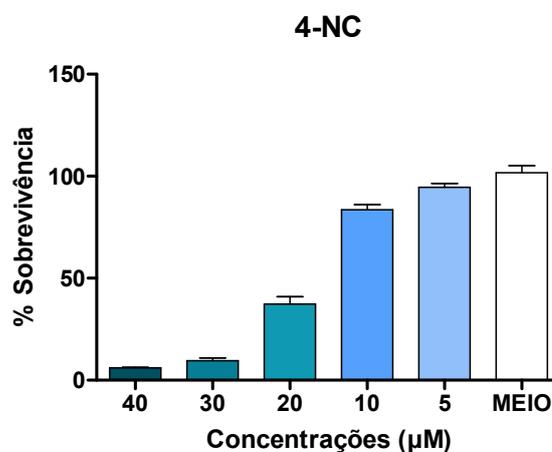


Figura 20: Avaliação da citotoxicidade do composto 4-nerolidilcaltecol. Células RAW 264.7 (10^5 células/poço) foram incubadas com as concentrações de 40, 30, 20, 10 e 5 μ M. Após 48 horas, o percentual de sobrevivência foi determinado através do MTT.

Uma vez determinadas as concentrações não tóxicas, foi investigada a influência do composto 4-NC na produção de Óxido Nítrico, da quimiocina MCP-1 e das principais citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata, (IL-1 β , TNF- α e IL-6) em linhagens de macrófagos murinos (J774a.1 ou RAW264.7)

Os resultados demonstram que, assim como o extrato G14, o composto 4-NC também foi efetivo em reduzir a produção dos mediadores inflamatórios avaliados. Levando-se em conta a maior concentração, esta redução foi mais proeminente na citocinas TNF- α (redução de 4 vezes), IL-6 (redução de 4 vezes) e IL-1 β (redução de 5 vezes). De maneira surpreendente, o 4-NC não foi tão efetivo em reduzir a produção da quimiocinas MCP-1, influenciando sua produção somente na maior concentração **(Figura 21)**

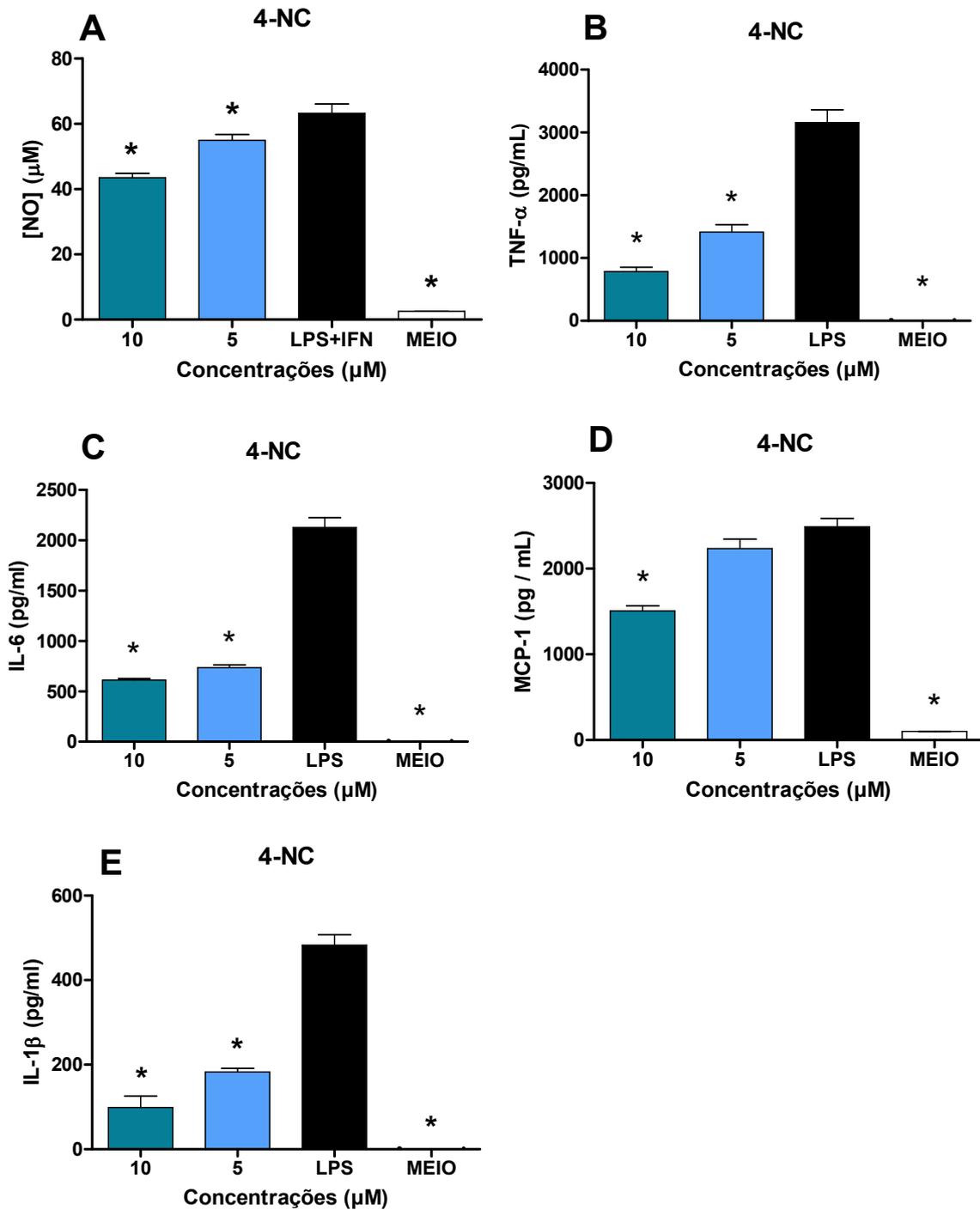


Figura 21: Avaliação da produção de NO (A) e das citocinas TNF-α (B) e IL-6(C) e quimiocina MCP-1(D) por células RAW 267.4 e produção da citocina IL-1β (E) por células J774a.1 tratadas com o composto 4-NC. Células RAW 264.7 e J774A.1a.1 foram plaqueadas (10^5 células/poço), e estimuladas com LPS ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou LPS ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$) e IFN- γ (20U.mL^{-1}) por 1 hora. Em seguida foram tratadas com as concentrações de 10 e $5\mu\text{M}$. Após 48 horas, foi feita a avaliação da produção de nitritos através da reação de Griess e os níveis de TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-1 β foram avaliados através do ELISA. As amostras foram comparadas com o controle estimulado (LPS+IFN- γ ou LPS). (*) $P < 0.05\%$ (ANOVA/Dunnet)

5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CO-ESTIMULADORES (CD40 E CD80) EM CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM O COMPOSTO 4-NC

Uma vez comprovada a influência do composto 4-NC na produção de mediadores inflamatórios, sua atividade imunomoduladora também foi avaliada através da inibição da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD40, bem como sobre a proliferação de linfócitos e a produção de IFN- γ .

Mais uma vez, o 4-NC apresentou resultado muito semelhante ao extrato, reduzindo a expressão de CD40 de forma mais proeminente (em ambas as concentrações) e a expressão de CD80 de maneira discreta, somente em sua maior concentração (**Figuras 22A e 22B**). O composto também se mostrou efetivo em modular a proliferação de linfócitos e a produção de IFN- γ induzidas por Concanavalina A, assim como mostram as **Figuras 22C e 22D**.

Os dados apresentados acima demonstram que o composto 4-NC apresenta atividade muito semelhante aquela encontrada para o extrato G14, o que sugere que este composto majoritário seja o grande responsável pelas ações anti-inflamatórias/imunomoduladoras observadas no extrato.

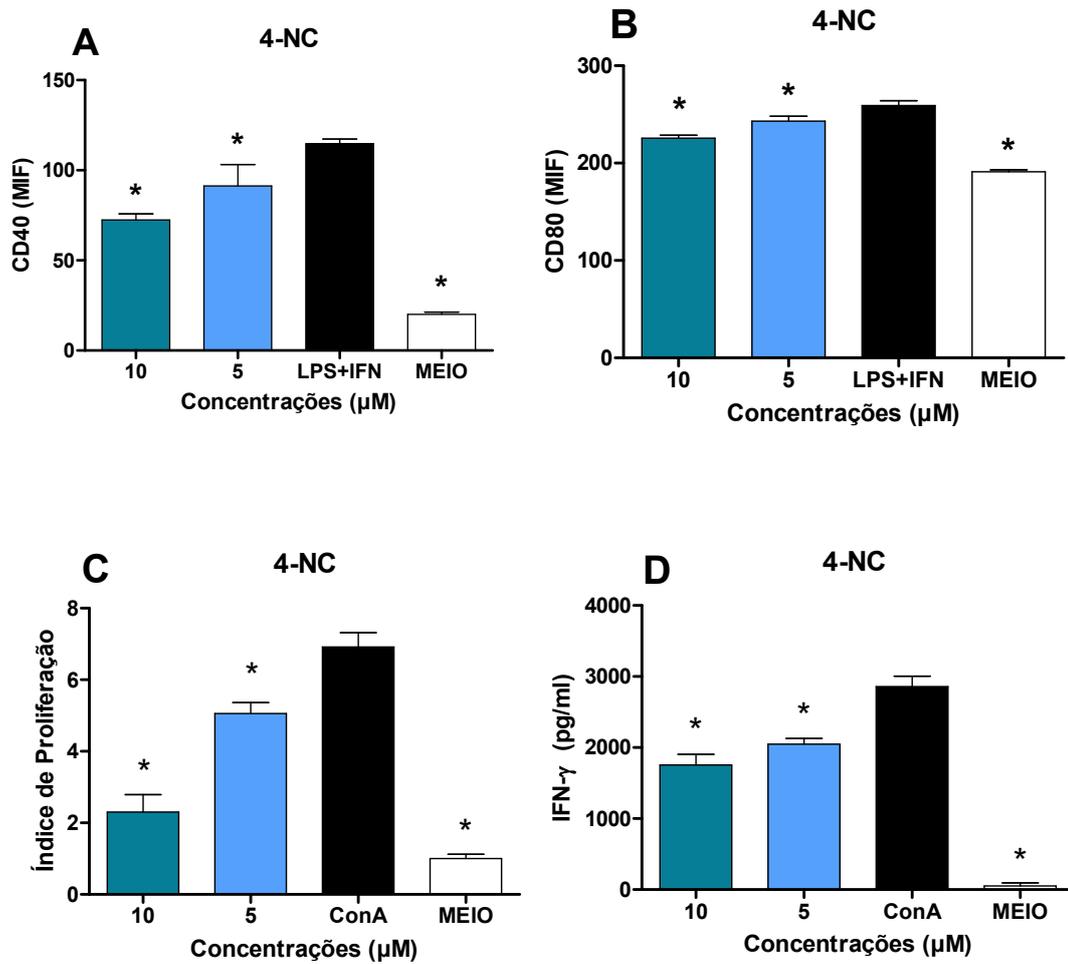


Figura 22: Efeitos do tratamento com o composto 4-NC na expressão de moléculas co-estimuladoras, na proliferação de linfócitos e produção de IFN- γ . Células RAW264.7 foram estimulados com LPS+IFN- γ e esplenócitos de camundongos C57BL/6 foram cultivados na presença do estímulo ConA (5 μ g.mL⁻¹). Em seguida, foram tratados com o composto 4-NC. Após 24h de incubação foi determinada, por citometria de fluxo, a expressão de (A) CD40 e (B) CD80 em células RAW264.7. Os dados foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF). Após 72 horas, o índice de proliferação celular em esplenócitos foi avaliado pelo método de MTT e os níveis de IFN- γ pelo ensaio de ELISA. Como controles foram utilizadas células estimuladas e não tratadas, bem como células não estimuladas e não tratadas. O índice de proliferação foi calculado levando-se em conta a metabolização do MTT de células estimuladas e células não estimuladas (*) P<0.05% em relação ao grupo LPS+IFN- γ ou ConA. (ANOVA/Dunnet)

5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS EXTRATOS DE *S. chilensis*, *A. cymbifera* E *P. umbellatum* EM CÉLULAS 4T1 (CARCINOMA MAMÁRIO MURINO) E B16 (MELANOMA MURINO)

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma, correspondendo a 25% de novos casos de câncer a cada ano (INCA, 2016). Já o melanoma representa menos de 4% dos casos de câncer de pele, porém é a causa da maioria das mortes causadas pela doença devido a sua alta capacidade metastática (INCA, 2016).

Por fim, uma vez determinada a ação dos extratos de *S. chilensis*, *A. cymbifera* e *P. umbellatum* sobre o sistema imune e seus mediadores, o presente estudo também objetivou avaliar a influência destes extratos na sobrevivência de células de linhagens tumorais de câncer de mama (4T1) e de pele (B16). Para isso, as células foram cultivadas e tratadas com as concentrações não tóxicas dos extratos, determinadas previamente. Após 48 horas, a viabilidade das células tumorais foi averiguada por MTT.

Conforme demonstrado na **Figura 23**, o extrato G10 foi capaz de reduzir a viabilidade tanto de células 4T1 quanto de B16 para níveis em torno de 60%, em sua maior concentração. O extrato G11, por sua vez, reduziu a sobrevivência apenas de células B16, na concentração de 50µg/ml. Já o G12 reduziu a viabilidade em aproximadamente 50% em suas duas maiores concentrações em células 4T1. Por outro lado, em células B16, somente a concentração de 150µg/ml não foi eficaz em reduzir a sobrevivência destas células. Os compostos G13 e G14 não apresentaram atividade antitumoral em nenhuma concentração.

Os dados apresentados aqui nos levam a sugerir que o extrato G12 é o que apresenta atividade antitumoral mais promissora, visto que foi o extrato que mais afetou a sobrevivência das linhagens tumorais avaliadas. Cabe destacar que este extrato não apresentou citotoxicidade para células normais. Apesar disso, mais estudos serão realizados com este extrato a fim de identificar seu componente mais ativo bem como sua efetividade *in vivo*.

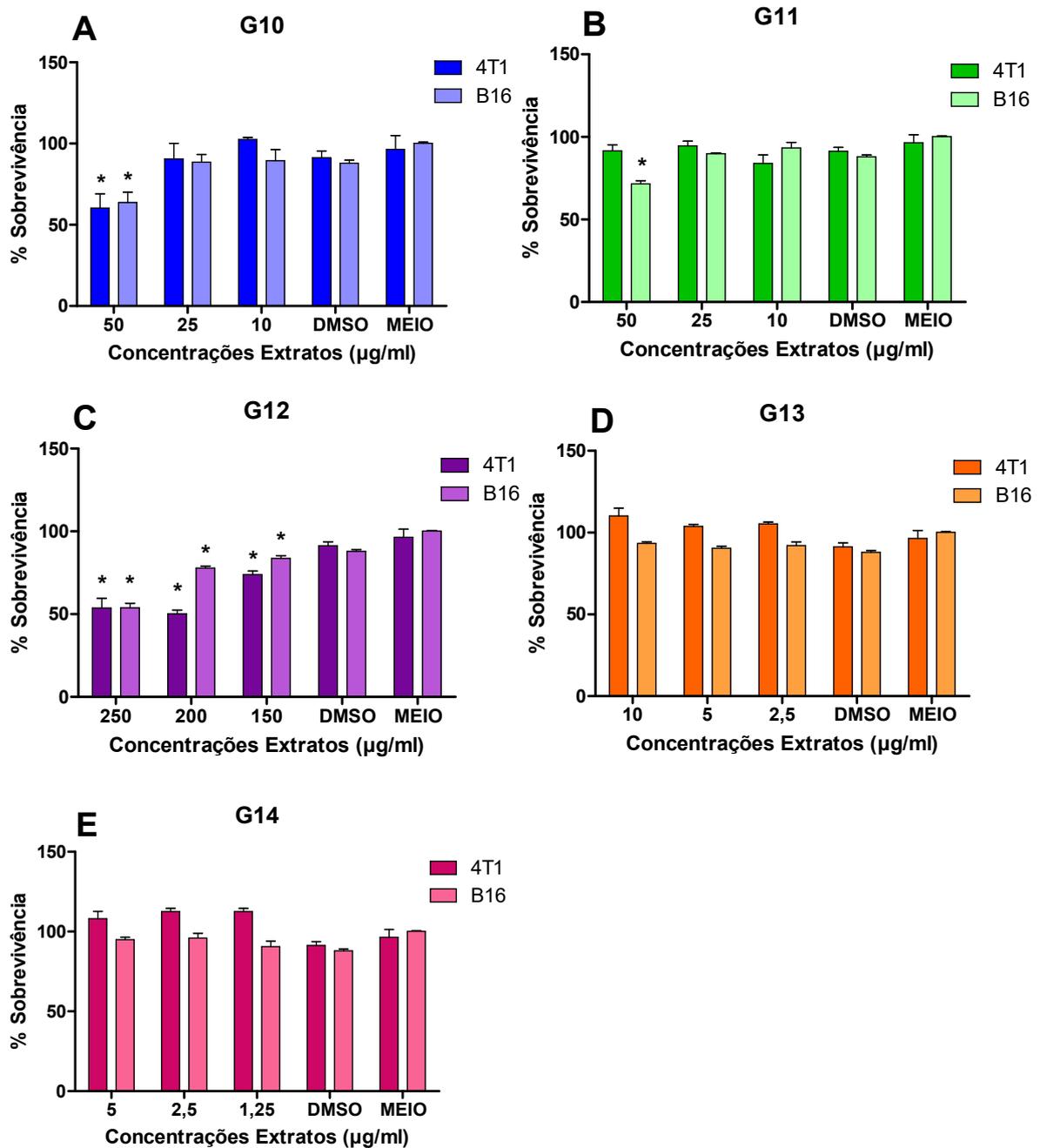


Figura 23: Avaliação da atividade antitumoral dos extratos de *S.chilensis*, *A. cymbifera* e *P. umbellatum* em células 4T1 e B16. Células 4T1 e B16 (10^5 células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos ou com o solvente DMSO (0,5%), durante 48 horas. A percentual de sobrevivência foi determinado pelo método de MTT. Células não tratadas (MEIO) foram consideradas como 100% de sobrevivência. (*) $P < 0,05$. (ANOVA/Dunnet)

6. DISCUSSÃO

Conforme previamente comentado, tanto a as doenças de caráter inflamatório quanto o câncer são importantes patologias que acometem uma grande parcela da população e que ainda não possuem tratamentos satisfatórios. Assim, o foco do presente estudo foi a busca por compostos com potencial para constituir novas abordagens terapêuticas capazes de atuar mais eficientemente nestas enfermidades. Para isso, três espécies de plantas foram selecionadas com base em sua utilização na medicina popular - *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera* e *Piper umbellatum* – e extratos hidroalcoolicos ou diclorometanicos foram produzidos (**Quadro 1**).

Inicialmente, as concentrações não citotóxicas dos extratos foram determinadas em linhagens de macrófagos murinos RAW264.7. Dentre eles, aqueles oriundos de *S. chilensis* (G10, G11 e G12) foram os menos tóxicos não demonstrando esse efeito em concentrações até 50µg/ml (G10 e G11) ou 100µg/ml (G12). Não foram encontrados dados na literatura que mostrassem o efeito citotóxico desta planta em nenhum tipo de célula.

O extrato hidroalcoolico de raízes da planta *A. cymbifera* (G13) demonstrou maior citotoxicidade, induzindo significativamente a morte de células RAW264.7 em concentrações superiores a 10µg/ml. Estudos realizados por Silva Jr e colaboradores (2013) já haviam verificado que o extrato etanólico desta planta apresenta citotoxicidade em células MA104 (renais) de macacos em concentrações maiores que 10µg/ml, corroborando nossos achados.

Por último, o extrato G14 (Hidroalcoolico de raízes de *P.umbellatum*), foi o que apresentou o maior efeito tóxico sobre as células testadas, já demonstrando esse efeito em concentrações superiores a 5µg/ml. Embora não tenham sido encontrados dados na literatura que avaliassem a toxicidade desse extrato, estudos de Silva Jr e colaboradores (2014) evidenciaram que o tratamento de células CHO-K1 (células epiteliais de ovários de hamster) com o extrato hidroetanólico das folhas de *P. umbellatum* não apresentou citotoxicidade até a concentração de 200µg/ml, dado bem diferente do encontrado no presente estudo. Porém, alguns fatores podem explicar esta discrepância, tais como o tipo de célula utilizada para os ensaios (CHO-K1 e RAW 264.7), os diferentes locais de coleta das plantas e, principalmente, a parte da planta utilizada para a produção do extrato.

Uma vez determinadas as concentrações não tóxicas, os extratos foram submetidos a uma avaliação prévia da atividade ant-inflamatória através da dosagem de NO, TNF- α e MCP-1. Esses mediadores foram escolhidos com base na sua importante participação no estabelecimento do processo inflamatório (GUZIK *et al.*, 2003; DALY & ROLLINS, 2003; BRADLEY, 2008).

Conforme mostrado na **Figura 9**, os extratos G10 e G11 foram capazes de reduzir os níveis de NO em suas duas maiores concentrações (50 e 25 μ g/ml), enquanto o G12 não apresentou influência na produção deste mediador. Estes achados estão de acordo com estudos *in vivo*, realizados por Goulart e colaboradores (2007) que demonstram uma redução nos níveis de NO após o tratamento com o extrato aquoso de raízes de *S. chilensis* (25mg/kg) em modelo de inflamação com carragenina.

Uma vez que o extrato G12 não mostrou citotoxicidade na faixa de concentração avaliada (até 100 μ g/ml), mas também não se mostrou efetivo na redução de NO, uma nova faixa de concentração foi determinada (150 a 250 μ g/ml). Embora essas novas concentrações também não tenham exibido toxicidade, somente a maior concentração foi capaz de reduzir a produção de NO (**Figura 10**). Estes resultados sugerem que o extrato G12 pode apresentar uma fraca atividade sobre a produção de NO ou que a substância capaz de atuar sobre este mediador encontra-se em baixa concentração neste extrato.

Ainda não foram descritos na literatura a influência dos extratos de *A. cymbifera* (G13) na produção de óxido nítrico. Por outro lado, o presente estudo mostra que este extrato foi capaz de reduzir a produção de NO somente em sua maior concentração, não demonstrando um efeito tão proeminente. Já o extrato G14 parece ser o mais efetivo, sendo capaz de reduzir a produção de NO nas concentrações de 5 e 2,5 μ g/ml. Esse resultado está de acordo com prévios estudos que demonstraram uma forte atividade de “limpeza” (scavenging activity) do extrato metanólico de folhas de *P. umbelatum* sobre o óxido nítrico. Essa atividade foi atribuída a grande concentração de flavonoides presente no extrato (AGBOR, *et al.*, 2007).

A citocina TNF- α é considerada um importante mediador na patogênese da inflamação (LEWIS *et al.*, 1991), atuando no hipotálamo para induzir a febre, podendo causar também a perda de apetite e caquexia (MURRAY *et al.*, 2006). Embora não seja encontrado em doses altas em indivíduos saudáveis, os níveis de TNF- α no plasma e nos tecidos de indivíduos com doenças inflamatórias como artrite

reumatoide, mieloma múltiplo e psoríase são muito elevados (ROBACK, et al, 1998; NURNBERGE et al., 1995). Esses altos níveis contribuem também para que ocorra o choque séptico (MURRAY et al., 2006). O TNF- α ainda causa alterações endoteliais facilitando a adesão de neutrófilos e monócitos às células epiteliais e estimula a liberação de quimiocinas que atraem estes leucócitos (BRADLEY, 2008) e além disso, é capaz de induzir a expressão de iNOS em macrófagos, aumentando ainda mais o processo inflamatório (CUNHA et al., 1993). Por esse motivo, o tratamento de doenças inflamatórias com antagonistas desta citocina ou substâncias capazes de reduzir seus níveis, vem sendo alvo de muitos estudos (DINARELLO, 2010)

A avaliação da produção de TNF- α revelou que somente o extrato G14 foi capaz de reduzir significativamente a produção desta citocina (**Figura 11**), revelando o potencial anti-inflamatório deste extrato. Em concordância, Silva Jr e colaboradores (2016) reportaram um decréscimo dos níveis de TNF- α no plasma de animais tratados com o extrato hidroalcoólico de folhas de *P. umbellatum* em um modelo murino de úlcera gástrica.

Em relação aos extratos de *S. chilensis* e *A. cymbifera*, estudos conduzidos por Liz e colaboradores (2008), demonstraram que o extrato aquoso de raízes de *S. chilensis* foi capaz de inibir o aumento nos níveis de TNF- α em ratos Swiss, na concentração de 100mg/kg, no modelo de inflamação induzido pela carragenina. Este dado não confirma nossos resultados, visto que nenhum extrato desta planta (G10, G11 e G12) apresentou influência sobre esta citocina. Diferenças como o tipo de extrato, a parte da planta e a concentração utilizada, ou até mesmo o modelo de ensaio realizado podem explicar tal discrepância encontrada em ambos os trabalhos. Novamente, não foram encontrados dados na literatura que mostrem a influência de extratos de *A. cymbifera* na produção de TNF- α .

A quimiocina MCP-1, por sua vez, sofreu redução em seus níveis com o tratamento com os extratos G10, G11, G13 e G14, onde novamente o último se destacou, uma vez que foi efetivo em suas duas maiores concentrações. A redução nos níveis de MCP-1 é uma característica muito desejada visto que essa quimiocina está envolvida diretamente no processo inflamatório e na patologia de diversas doenças (DALY e ROLLINS, 2003). Shimizu e colaboradores (2004), observaram que o bloqueio desta quimiocina, utilizando anticorpos anti-MCP-1, foi capaz de diminuir o acúmulo de macrófagos no glomérulo, atenuando a nefrite lúpica em camundongos MLR/lpr (camundongos modificados geneticamente para desenvolverem

espontaneamente lúpus eritematoso sistêmico). Esta mesma terapia com anticorpos anti-MCP-1 foi utilizada por Ogata e colaboradores (1997), em modelo de artrite reumatoide, onde ratas DR/BB (camundongos modificados geneticamente para desenvolverem espontaneamente artrite reumatóide) apresentaram melhora no inchaço e diminuição do infiltrado de macrófagos nas articulações. Além disso, já foi comprovado que os níveis de MCP-1 são muito elevados em indivíduos com aterosclerose (NAMIKI et al., 2002) e doenças inflamatórias intestinais (SPOETTL et al., 2006).

Uma vez avaliada a ação dos extratos sobre a produção de NO, TNF- α e MCP-1, somente o extrato G14 foi selecionado para os demais testes, visto que foi o único capaz de reduzir a produção destes três mediadores. A partir daí outras citocinas importantes no processo inflamatório também foram avaliadas, assim como a expressão de moléculas coestimuladoras e a influência deste extrato sobre a proliferação de linfócitos. Para estes ensaios, foram utilizadas as maiores e mais eficazes concentrações do extrato (5 e 2,5 μ g/ml).

A **Figura 13** mostra que, assim como ocorreu com o TNF- α e a MCP-1, o extrato G14 também foi efetivo na redução das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-12, consideradas citocinas pró-inflamatórias.

A citocina IL-1 β desempenha papel muito importante no curso da inflamação. Ela induz o aumento da expressão de moléculas de adesão que estão associadas com o processo aterosclerótico e, além disso, pode estimular a produção de IL-6 e a indução de febre, juntamente com o TNF- α (DINARELLO, 2010; FRANCISCO et al., 2006). Além disso, a IL-1 β aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos e ainda estimula a liberação de proteínas de fase aguda e a expressão de COX2, atuando indiretamente como um mediador hipernociceptivo (DINARELLO, 1984; 1998; VERRI et al., 2006). O bloqueio desta citocina vem sendo alvo de estudos e já se mostrou efetivo no tratamento de diversas doenças como artrite reumatoide, gota e diabetes do tipo 2 (DINARELLO, 2010).

Em relação a IL-6, Segundo Hirano e colaboradores (1992), altos níveis desta citocina no sangue e em fluidos biológicos são encontrados em pacientes com doença de Cronh e retocolite ulcerativa idiopática, ambas doenças inflamatórias crônicas. Além disso, estudos realizados em pacientes com doenças inflamatórias intestinais, como as citadas acima, demonstraram que os maiores produtores de IL-6, TNF- α e IL-1 β no intestino são macrófagos ativados, juntamente com células epiteliais

(REIMUND et al. 1996). A redução da atividade de IL-6 reduz a inflamação articular, previne lesão a longo prazo e melhora efeitos sistêmicos da artrite reumatóide como anemia, fadiga e osteoporose (MAINI, et al., 2006)

Cabe destacar que estudos clínicos em pacientes com artrite reumatoide têm demonstrado uma notável redução na inflamação assim como o retardamento na destruição das articulações, através da inibição da ação de TNF- α , IL-1 β e IL-6, por meio de antagonistas específicos (NUKI et al., 2002; SCHEINBERG et al., 2005; IKEDA; COX; EMERY, 2007; WOODRICK E RUDERMAN, 2010). Por este motivo, compostos que consigam inibir a produção destes mediadores em conjunto, poderiam se tornar boas alternativas no tratamento desta importante enfermidade.

A citocina IL-12 também possui um papel de fundamental importância, já que faz a ligação entre a imunidade inata e adaptativa. Esta citocina está relacionada ao estabelecimento de um perfil Th1, com consequente produção de IFN- γ . Esta última está diretamente relacionada ao processo inflamatório uma vez que induz macrófagos a produzirem NO e TNF- α , entre outros mediadores. Níveis elevados de IL-12 já foram encontrados em diversas patologias, tais como psoríase (ARICAN et al., 2005), mieloma múltiplo (ADORINI, 1999), doenças inflamatórias intestinais (PARRONCHI, et al., 1997) e artrite reumatoide (PETROVIC-RACKOV, L.; PEJNOVIC, N., 2006) Assim, a proeminente redução na produção desta citocina induzida pelo extrato G14 poderia ser benéfica em todas estas enfermidades.

É importante ressaltar que a IL-12 faz parte da família das citocinas heterodiméricas, sendo formada por duas subunidades, a IL-12p40 (avaliada neste estudo) e a IL-12p35. Estas subunidades se juntam para formar a IL-12p70 que é a forma biologicamente ativa desta molécula. Entretanto, a subunidade p40 (IL-12p40) também pode se juntar a subunidade p19 (IL-12p19) e assim formar a citocina IL-23 (OPPMANN et al., 2000), que se mostrou intimamente envolvida na diferenciação de linfócitos T para o perfil Th17 (AGGARWAL et al., 2003). Linfócitos Th17 por sua vez produzem a citocina IL-17 que tem sido associada aos mais diversos tipos de doenças de caráter inflamatório, incluindo artrite reumatóide (ZIOLKOWSKA et al., 2000), psoríase (MARINONI et al., 2014) e esclerose múltipla (LOCK et al., 2002). Sendo assim, considerando que o extrato analisado aqui é um potente redutor da subunidade p40 da citocina IL-12, é razoável inferir que este também atua inibindo a produção de IL-23 e consequentemente a IL-17, o que o torna promissor no tratamento das

patologias citadas. Outros experimentos ainda precisam ser realizados para comprovar esta hipótese.

Uma vez que o extrato G14 reduziu os diversos mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos, uma hipótese plausível para seu mecanismo de ação seria o aumento da produção da citocina IL-10. Conforme já comentado, essa citocina apresenta um caráter regulatório, inibindo a produção de diversas outras citocinas, tais como a IL-1 β , IL-6 e o TNF- α (CHOI *et al.*, 2007). Apesar disso, a **Figura 13D** mostra que, de forma contraditória, o extrato G14 não influencia na produção desta citocina. Este resultado sugere que a influencia do extrato sobre a produção dos mediadores inflamatórios ocorre diretamente na via de produção e não de maneira indireta através da produção de IL-10. Mais estudos ainda serão conduzidos para desvendar os mecanismos de ação utilizados por este extrato.

Outra importante ação do extrato G14 foi a redução das moléculas CD80 e CD40 presentes na superfície dos macrófagos. Conforme previamente comentado, o CD80 possui papel fundamental na ligação da imunidade inata com a imunidade adaptativa uma vez que está envolvido na ativação e expansão de células T (ALEGRE, FRAUWIRTH E THOMPSON, 2001). Já o CD40 é capaz de estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias (ALDERSWON *et al.*, 1993) e regular a expressão dos co-estimuladores CD80 e CD86 (KIENER *et al.*, 1995). Neste contexto, a menor expressão destas moléculas induzida pelo extrato G14 pode contribuir com a menor produção de mediadores inflamatórios bem como modular a resposta imune adquirida, reduzindo a ativação de células T.

Atualmente, terapias que visam as moléculas coestimuladoras também vêm sendo muito estudadas. O imunossupressor Abatacepte, utilizado para tratamento da artrite reumatoide, se liga as moléculas CD80 e CD86 presentes nas APCs. Essa ligação bloqueia a ativação do receptor CD28 na célula T, levando a inibição da ativação de linfócitos T (RODRIGUES, *et al.* 2010; YU *et al.*, 2013). De maneira semelhante, anticorpos monoclonais contra CD40 e CD40L vêm sendo utilizados a fim de bloquear interações celulares que sustentem o processo inflamatório (DANESE, SANS E FIOCCHI, 2004). Este bloqueio já se mostrou eficaz na prevenção e no tratamento de colite em modelos animais de doenças inflamatórias intestinais (de JONG *et al.*, 2000; CONG *et al.*, 2000). Testes clínicos já estão sendo realizados com antagonistas destas moléculas em pacientes com diversas doenças crônicas e/ou

autoimunes, como psoríase, púrpura, esclerose múltipla e lúpus eritematoso sistêmico (DOUMONT, 2002).

Além da imunidade inata, a ação do extrato G14 sobre a imunidade adquirida também foi determinada através do índice de proliferação e da produção de IFN- γ por esplenócitos. As **Figuras 15 e 16** demonstram que, assim como ocorreu com macrófagos, o extrato também foi efetivo em modular a resposta imune adquirida, reduzindo significativamente a proliferação e a produção de IFN- γ . Neste contexto, embora não possam ser associados diretamente, a redução da proliferação celular e da produção de IFN- γ assim como a redução da expressão de co-estimuladores e do CD40 sugerem que, *in vivo*, o extrato G14 apresente um importante efeito imunomodulatório, sugerindo seu uso em doenças auto-imunes e de hipersensibilidade.

Devido a sua excelente atuação *in vitro*, a ação do extrato G14 também foi avaliada *in vivo*, utilizando um modelo de edema de orelha induzido por óleo de Cróton. Conforme comentado por Pinto e colaboradores (2015), este modelo é muito prático e útil visto que, além de fornecer resultados rápidos, seu agente flogístico ativa diversas vias relacionadas ao processo inflamatório. Assim, compostos com diferentes mecanismos de atuação podem responder de maneira eficiente neste modelo.

O gráfico das **Figuras 17, 18 e 19** mostram que, conforme esperado, o tratamento com G14 reduziu efetivamente o edema de orelha. Em concordância, também foi observado uma considerável redução no infiltrado inflamatório e na produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e MCP-1 no tecido auricular. Estes achados demonstram que, assim como ocorreu *in vitro*, o extrato também foi efetivo na redução do processo inflamatório *in vivo*.

Além das citocinas, também foi observada uma efetiva redução na concentração da enzima mieloperoxidase, encontrada após o tratamento com o extrato. A MPO é uma enzima expressa principalmente por neutrófilos, mas também por macrófagos, estando relacionada a geração de espécies reativas de oxigênio importantes para a destruição de patógenos que tenham sido fagocitados por estas células. Além disso, a MPO está envolvida na homeostase celular e na iniciação e progressão da inflamação (VAN DER VEEN, et al. 2009). Assim, a redução da atividade de MPO encontrada em nosso estudo pode sugerir que o G14 efetivamente atue na redução desta enzima ou, mais provavelmente, que esta redução seja um

reflexo do menor número de neutrófilos recrutados para o local inflamado. Em ambos os casos, o resultado seria uma redução do processo inflamatório.

É importante ressaltar que o extrato G14 reduziu o edema auricular em ambas as concentrações avaliadas (0,1 e 1 mg/orelha). Apesar disso, a redução na produção de citocinas ocorreu somente na maior concentração. Este resultado sugere que, além da atividade sobre as citocinas pró-inflamatórias, o extrato também seja capaz de atuar em outras vias deste processo. Nesse sentido, Nunes e colaboradores (2005) relataram que o composto 4-NC isolado tanto de extratos de *P.umbellatum* quanto de *P. peltatum* foram capazes de inibir a atividade enzimática da fosfolipase A2 (FLA2). A FLA2 é a enzima responsável pela liberação do ácido aracdônico (GUYTON e HALL, 1997) que por sua vez é essencial para o processo inflamatório, visto que atua na liberação de mediadores como as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, entre outros. Além disso, a inibição da FLA2 pode levar a uma redução da produção de mediadores quimiotáticos, reduzindo assim, a migração celular (RATH E AGGARWAL, 1999). Neste contexto, uma vez que o G14 inibiu a produção de MCP-1 (importante fator quimiotático) tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de reduzir o infiltrado inflamatório, é plausível sugerir que a inibição de fosfolipases A2 possa ser um dos seus possíveis mecanismos de ação.

De forma semelhante ao encontrado aqui, estudos prévios, utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina, demonstraram uma redução no processo inflamatório após tratamento com o extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *P.umbellatum* (PERAZZO et al. 2005). Além disso, utilizando estes mesmo modelo, Iwamoto e colaboradores (2015) apontou, não só uma redução no processo inflamatório, mas também inibição da migração leucocitária após o tratamento com extrato diclorometano de folhas de *P.umbellatum*. Resultados semelhantes também foram reportados utilizando-se extrato metanólico de folhas da espécie *Piper peltatum*, (DESMARCHELIER, SLOWING e CICCIA, 2000).

Apesar dos diversos estudos demonstrando a atividade anti-inflamatória de derivados de *P. umbellatum*, não existem trabalhos que demonstrem a ação de extratos de raízes dessa espécie diante da produção de citocinas, quimiocinas e mieloperoxidase bem como sobre a imunidade adquirida, o que ressalta o ineditismo do presente estudo.

Conforme previamente comentado, o composto majoritário dos extratos de *P. umbellatum* é o metabólito secundário 4-NC. Este tem sido apontado como o principal

responsável por grande parte das atividades biológicas apresentadas pela espécie (KIJJOA, 1980). Devido a isso, a influência do composto 4-NC na modulação do sistema imune também foi avaliada. Os resultados reportados nas **Figuras 21 e 22**, evidenciam que, assim como o G14, concentrações não tóxicas de 4-NC também reduzem a produção de NO e citocinas pro-inflamatórias, bem como a expressão de moléculas de superfície, a proliferação celular e a produção de IFN- γ . Tais resultados reforçam a ideia de que realmente este metabólito é o grande responsável pelas atividades biológicas do G14 avaliadas neste trabalho.

Embora não tenham sido encontrados dados que demonstrem diretamente a ação do composto 4-NC sobre os mediadores inflamatórios, estudos prévios conduzidos por Costa e colaboradores (2013), relataram a inibição da migração celular, da ação da fosfolipase-A2 e da produção da citocina TNF- α após tratamento com um análogo do 4-NC, chamado LQFM002. Estes achados estão de acordo com o presente estudo que também observou redução de TNF- α e de MCP-1 (que atua na migração) em resposta ao tratamento com 4-NC.

Tem sido demonstrado que a atividade anti-inflamatória de um composto pode estar relacionada a sua atividade antioxidante (DE LA FUENTE, M.; VICTOR, V., 2000). Neste contexto, diferentes estudos têm atribuído ao 4-NC uma potente atividade antioxidante. Barros e colaboradores (1996) avaliaram esta atividade *in vitro*, com o extrato etanólico de raízes e folhas de *P. umbellatum*. Seus resultados demonstraram uma redução na peroxidação lipídica, a qual foi atribuída ao 4-NC. Além disso, Ropke e colaboradores (2002) também atribuíram ao 4-NC uma potente atividade antioxidante sobre a pele encontrada no extrato de raízes de *P. umbellatum*. Esta atividade foi responsável pela redução dos efeitos do fotoenvelhecimento induzido por raios UVB. Assim, é coerente sugerir que os efeitos anti-inflamatórios observados no presente estudo possam estar, pelo menos em parte, relacionados ao potencial antioxidante deste composto.

Além da atividade anti-inflamatória, os extratos de *Solidago chilensis*, *Aristolochia cymbifera* e *Piper umbellatum* também foram avaliados para sua atividade antitumoral *in vitro* em modelo de câncer de mama (4T1) e melanoma (B16). Estes tipos de câncer foram selecionados devido a sua elevada incidência (4T1) ou agressividade (B16), além de serem extensivamente estudados (FIDLER, 1973; HAPPNER, 2000; PULASKI, 2001; FORD, 2009; SOUZA, 2013; GIAVAZZI e DECIO, 2014)

Conforme mostrado na **Figura 23**, somente o extrato G10 (Hidroalcoólico de raiz de *Solidago chilensis*) e G12 (Diclorometano de partes aéreas de *Solidago chilensis*) foram efetivos na redução da viabilidade de ambas as linhagens estudadas. Entretanto, de forma surpreendente, a atividade antitumoral foi mais pronunciada no extrato G12, visto que foi observada nas três concentrações estudadas (250, 200 e 150µg/ml). É importante ressaltar que o extrato G12 foi o que menos apresentou citotoxicidade em células RAW 264.7 (**Figura 10A**), o que sugere que este composto apresente uma certa seletividade para células tumorais.

Em consonância com os resultados aqui apresentados, Monks e colaboradores (2002) verificaram que extratos de folhas, caules e raízes de *Solidago chilensis* apresentam atividade inibitória no crescimento das linhagens tumorais HT29 (adenocarcinoma de cólon) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão). Além disso, já foi relatado que saponinas isoladas de espécies deste gênero também apresentaram atividade antitumoral em ensaio *in vivo*, utilizando modelo de sarcoma (PLOHMANN et al., 1997).

De maneira inesperada, o composto G14 não foi capaz de reduzir a viabilidade das células 4T1 e B16 em nenhuma concentração testada. Este resultado está em desacordo com estudos conduzidos por Iwamoto e colaboradores (2015), que verificaram uma potente atividade antiproliferativa do extrato diclorometano de folhas de *P. umbellatum* sobre diversas linhagens de células tumorais humanas, como UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão), HT-29 (cólon), PC-3 (próstata), 786-0 (rim), em concentrações menores que 15µg/ml. Essas discrepâncias podem estar relacionadas a diversos fatores, tais como: I) as diferentes concentrações utilizadas, visto que no presente trabalho verificou que somente concentrações abaixo de 5µg/ml são seguras para células não-tumorais; II) diferenças da parte da planta utilizada (raiz x folhas) e na produção do extrato (hidroalcoólico x diclorometano) e III) diferenças de procedência dos extratos, como o local e a época do ano em que foi realizada a coleta da planta.

Por ser o único ensaio antitumoral realizado, não é possível sugerir os mecanismos pelos quais os extratos G10 e G12 foram capazes de reduzir a sobrevivência das células tumorais. Entretanto, ensaios de necrose/apoptose, bem como da sinalização relativa a morte celular já fazem parte das perspectivas deste estudo. Também se incluem nas perspectivas a avaliação da ação dos compostos em modelos *in vivo* de câncer de mama e de melanoma.

6- CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- a) O extrato G14 (hieroalcoólico de raízes de *Piper umbelatum*), apresenta pronunciada atividade anti-inflamatória, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo ainda capaz de modular eventos da imunidade adquirida.
- b) O composto majoritário 4-Nerolidilcatecol, parece ser o principal responsável pelas ações do extrato G14, uma vez que apresenta atividade bastante semelhante ao extrato.
- c) O extrato G12 é o mais promissor em relação a atividade anti-tumoral visto que reduziu a sobrevivência de células tumorais sem apresentar toxicidade para células normais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução da 7ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, p. 2, 2011.

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; REYESCHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. v. 25, n. 9, p. 1188-1191, 2002.

ABEGUNDE, D. O.; MATHERS, C. D.; ORTEGON, M.; STRONG, K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *The Lancet*, v. 370, n. 9603, p. 1929-1938, 2007.

ADAMI, H.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. *Textbook of Cancer Epidemiology*, Oxford: Oxford University Press, 2. 2008.

ADORINI L. Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 55, p. 1610–1625. 1999

AGBOR, G. A.; VINSON, J. A.; OBEN, J. E.; NGOGANG, J. Y. In vitro antioxidant activity of three Piper species. *Journal Of Herbal Pharmacotherapy*, v. 7, n. 2, p. 49-64. 2007.

AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M.MH; SAUVAGE, F.J.; GURNEY A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 1910–1914, 2003.

ALAM, R., GORSKA, M. Lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 111, p. 476-485, 2003.

ALDERSON, M. R.; ARMITAGE, R. J.; TOUGH, T.W.; STROCKBINE, L.; FANSLAW, W. C.; SPRIGGS, M. K. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 178, p. 669–674, 1993.

ALLAVENA, P.; SICA, A.; SOLINAS, G.; PORTA, C.; MANTOVANI, A. 2008. The inflammatory micro environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2008.

ALEGRE, M. L., K. A. FRAUWIRTH; THOMPSON, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Reviews Immunology*, v. 1, p. 220-228, 2011.

ALLER, M. A., ARIAS, J.L., ARIAS, J.I., SÁNCHEZ-PATÁN, F., ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. *Medical Hypotheses*, v. 68, n. 1, p. 202-209. 2007.

ALVIANO, W.S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. M. G.; BOLOGNESE, A. M. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*, v. 53, p. 545-552, 2008.

AL-SARIREH, B. & EREMIN, O. Tumor-associated macrophages (TAMs): disordered function, immune suppression and progressive tumor growth. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*, v. 45, n. 1, p. 1-16. 2000.

ANJOS, A. C. Y; ZAGO, M. M. F. A experiência da terapêutica quimioterápica oncológica na visão do paciente. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 14, n. 1, p. 33-40, 2006.

ARICAN, O.; ARAL, M.; SASMAZ, S.; CIRAGIL, P. Serum Levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity. *Mediators of Inflammation*, v. 2005, n. 5, p. 273-279, 2005.

ASANUMA, M. NISHIBAYASHI-ASANUMA, S.; MIYAZAKI, I.; KOHNO, M.; OGAWA, N. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *Journal of Neurochemistry*, v. 76, n. 6, p. 1895-1904, 2001.

BALBINO, C. A. Anti-inflamatórios: uma compreensão total. *Revista Pharmacia Brasileira*, v. 81, 2011.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, v. 357, p. 539-545, 2001.

- BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science*, v. 94, p. 557-572, 1998.
- BARON, J. A.; SANDLER, R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annual Review of Medicine*, v. 51, p. 511-523, 2000.
- BARROS, S. B. M.; TEIXEIRA, D. S.; AZNAR, A. E.; MOREIRA JÚNIOR.; J. A.; ISHII, I.; FREITAS, P. C. D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. *Miq. Ciência e Cultura*, v. 48, p.114-116, 1996.
- BAUHMANN, H.; GAUDIE, J. The acute phase response. *Immunology Today*, v. 15, p. 74-80, 1994.
- BAYER, G. F.; GOES DE PAULA, S. Mortalidade nas capitais brasileiras 1930-1980. Rio de Janeiro. *Dados-Radis*, v. 7, p. 1-8, 1984.
- BEATTIE, C.W.; TISSOT, R.; AMOSS, M. Experimental models in human melanoma research: a logical perspective. *Seminars in Oncology*, v. 15, p. 500-511, 1988.
- BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; DASGUPTA, B.; MAZUMDER, D.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *Journal of Infectious Disease*, v. 185, p. 1704-1708. 2002.
- BOISE, L. H., M. GONZALEZ-GARCIA, C. E. POSTEMA, L. DING, T. LINDSTEN, L. A. TURKA, X. MAO, G. NUNEZ; THOMPSON, C.B. Bcl-X, a Bcl-2-Related Gene that Functions as a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death. *Cell*, v. 74, p. 597-608, 1993.
- BONASSA, E.M.A.; SANTANA, T.R. *Enfermagem em Terapêutica Oncológica*. 3ª Edição. São Paulo. SP, Atheneu, 2005.
- BRADLEY, J. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.
- BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E, S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRITO, N. M. B.; SAMPAIO, P.C.M.; CASTRO, A. A. H.; OLIVEIRA, M. R. Características clínicas de mulheres com carcinoma ductal invasivo submetidas à quimioterapia neoadjuvante Revista Paraense de Medicina, v. 21, n. 4, p.1-10. 2007.

BROEK, M. F.; KAGI, D.; ZINKERNAGEL, R. M.; HENGARTNER, H. Perforin dependence of natural killer cell mediated tumor control in vivo. European Journal of Immunology, v. 25, n. 12, p. 3514-3516, 1995.

BROHEM, C. A.; SAWADA, T. C.; MASSARO, R. R.; ALMEIDA, R. L.; RIVELLI, D. P.; ROPKE, C. D.; DA SILVA, V. V.; DE LIMA, T. M.; CURI, R.; BARROS, S. B.; MARIA-ENGLER, S. S. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. Toxicology in Vitro, v. 23, n. 1, p. 111-119, 2009.

BROHEM, C. A.; MASSARO, R. R.; TIAGO, M.; MARINHO, C. E.; JASIULIONIS, M. G.; DE ALMEIDA, R. L.; RIVELLI, D. P.; ALBUQUERQUE, R. C.; DE OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A. P. M.; OKADA, S.; SOENGAS, M. S.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. Pigment Cell & Melanoma Research, v. 25, n. 3, p. 354-369, 2012

BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. The Lancet Oncology, v. 5, n. 8, p. 497-508, 2004.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman - Manual de farmacologia e terapêutica. 11ª Edição. Porto Alegre: Artmed, p. 1220, 2010.

BUTTGEREIT, F.; BURMESTER, G. R.; SIMON, L. S. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2-specific inhibitors. American Journal of Medicine. v. 19, n.; p. 110, 2001

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CAMPORESE, A.; BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ESPÓSITO, R. G.; MORSELLINO, N.; DE SIMONE, F. & TUBARO, A. Screening of antibacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). Journal of Ethnopharmacology, v. 87, p. 103-107, 2003.

CARNEIRO, R.S. Análise Da Expressão Diferencial Dos Genes Envolvidos Na Resposta Inflamatória Aguda E Crônica E Sua Influência Na Carcinogênese Química

Cutânea Em Camundongos Geneticamente Selecionados Para Alta Ou Baixa Reatividade Inflamatória Aguda. Dissertação de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

CARRUTH, L. M.; S. DEMCZUK; MIZEL. S. B. Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin-1 precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 12162–11217, 1991.

CARVALHO, J.C.T. Formulário Médico – Farmacêutico de Fitoterapia.; Ciência Brasilis, Belo Horizonte, MG. p. 2-9, 2005.

CARVALHO, M. T. Avaliação de fatores prognósticos em tumores de mama nos estádios 2A e 3B e sua correlação com sobrevida. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 21. 2010.

CASTONGUAY, A.; RIOUX, N.; DUPERRON, C.; JALBERT, G. Inhibition of lung tumorigenesis by NSAIDS: A working hypothesis. *Experimental Lung Research*, v. 24, p. 605-615, 1998.

CECHINEL FILHO. V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quimica Nova*, v. 21, p. 99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V. Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais. Correlação estrutura química-atividade biológica Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, p. 7-9, 1995.

CHAI, Z.; GATTI, S.; TONIATTI, C.; POLI, V.; BARTFAI, T. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 β : a study on IL-6 deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 183, p. 311-316, 1996

CHAPLIN, D.D. Overview of the human immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 117, n. 2, p. 430-435, 2006.

CHOI K.M., RYU O.H., LEE K.W., KIM H.Y., SEO J.A., KIM S.G., CHOI, D. S.; BAIK, S. H. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 75, p. 235-40, 2007.

CIRINO, C., FIORUCCI, S., SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, p. 91-95, 2003.

CLARK, I. A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 18, p. 335-343, 2007.

CONG, B. Y.; WEAVER, C. T.; LAZENBY, A. Colitis induced by enteric bacterial antigen-specific CD4⁺ T cells requires CD40-CD40 ligand interactions for a sustained increase in mucosal IL-12. *The Journal of Immunology*, v. 165, p. 2173–2182, 2000.

CONRAD, S.M.; AYALI, D.S.; FIELD, A.E.; MACK, M.; MOSSER, D.M. *Leishmania* derived Murine Monocyte Chemoattractant Protein-1 enhances the recruitment of a restrictive population of CC chemokine receptor 2-positive macrophages. *Infection and Immunity*. v. 75, n. 2, p. 653-665, 2007.

COSTA, E. A.; LINO, R. C.; GOMES, M. N.; NASCIMENTO, M. V. M.; FLORENTINO, I. F.; GALDINO, P. M.; ANDRADE, C.H.; REZENDE, K. R.; MAGALHÃES, L. O.; MENEGATTI, L. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of LQFM002 — A 4-nerolidylcatechol derivative. *Life Sciences*, v. 92, p.237–244, 2013.

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.

COUSSENS, L., M. & WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420, p. 860-867, 2002.

COX.G.W.; MELILLO.G.; CHATTOPADHYAY,U.; MULLET.D.; FERTEL.R.H.; VARESI.O.L. Tumor necrosis factor- α -dependent production of reactive nitrogen intermediates IFN- γ plus IL-2 induced murine macrophage tumoricidal activity. *Journal of Immunology*. v. 149, p. 3290-3296, 1992.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRUVINEL, W. M., MESQUITA JR, D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T., SOUZA, A. W. S., SILVA, N. P., ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória Revista Brasileira de Reumatologia, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUNHA.F.Q.; MOSS,D.W.; LEAL.L.M.C.C.; MONCADA,S.; LIEW.F.Y. Induction of macrophage parasitocidal activity by *Staphylococcus aureus* and exotoxins through the nitric oxide synthesis pathway. *Immunology*, v. 78, p. 563-567, 1993.

CUNHA, F. Q.; Assreuy, J.; Moncada, S.; Liew, F. Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology*, v. 79, n. 3, p. 408–411, 1993.

DANESE S.; SANS M.; FIOCCHI, C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut*, v. 53, p. 1035–1043, 2004.

DE LA FUENTE, M.; VICTOR, V. M. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunology & Cell Biology*, v. 78, n. 1, p. 49-54. 2000

DE MAEYER E.; DE MAEYER-GUINARD, J. Interferon-gamma. *Current Opinion in Immunology*, v. 4, p. 321-326, 1992

DESMARCHELIER, C.; BARROS, S.B.M.; REPETTO, M; LATORRE, L.R.; KATO, M. J.; CICCIA, G. 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe spp.* scavenges peroxy radicals and inhibits Fe (II)-dependent DNA damage. *Planta Med.*, v. 63, p. 561-563, 1997.

DESMARCHELIER, C.; SLOWING, K.; CICCIA, G. Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leaf methanol extract. *Fitoterapia*, v. 71, p. 556–558, 2000.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 antagonista. *International Reviews of Immunology*, v. 16, p. 457-499, 1998.

DINARELLO, C.A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, v. 140, p. 935–950, 2010.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª Edição. São Paulo: Editora UNESP. p. 604, 2003.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. *British Journal of Anaesthesia*, v. 75, p. 125-131, 1995.

DUARTE, B.M. Fatores de risco e proteção para Doenças Crônicas Não-Transmissíveis na população de Belo Horizonte. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, p.28. 2010.

DUMONT, F. J. IDEC-131. IDEC/Eisai. *Current Opinion in Investigational Drugs*, v. 3, p. 725–734, 2002

EBERSOLE, J.L.; CAPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontology* 2000, v. 23, p. 19-49. 2000

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

ELMORE, J. G.; ARMSTRONG, K.; LEHMAN, C.D.; FLETCHER, S.W. Screening for breast cancer. *JAMA*, v. 293, p. 1245-1256, 2006.

FERNANDES, K. S.; SILVA, A. H.; MENDANHA, S. A.; REZENDE, K. R.; ALONSO, A. Antioxidant effect of 4-nerolidylcatechol and α -tocopherol in erythrocyte ghost membranes and phospholipid bilayers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 46, n. 9, p. 780-788, 2013.

FERRARI-LACRAZ, S., NICOD, L.P., CHICHEPORTICHE, R., WELGUS, H.G.; DAYER, J.M. Human lung tissue macrophages, but not alveolar macrophages, express matrix metalloproteinases after direct contact with activated T lymphocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2001. v. 24, p. 442–51.

FERRI, M.G. *Plantas do Brasil - Espécies do cerrado*. Blucher Ltda e Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. Editora Edgard. 1969.

FIRCZUK, M.; NOWIS, D.; GOLAB, J. PDT-induced inflammatory and host responses. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 10, n. 5, p. 653-63, 2011.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature: New biology*, v. 242, p. 148–149, 1973.

FLAJNIK, M.F.; DU PASQUIER, L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends In Immunology*, v. 25, p. 640-644, 2004.

FORD, C.E.; EKSTROM, E.J.; ANDERSSON, T. Wnt-5a signaling restores tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, p. 3919-3924, 2009.

FOX-MARSH, A.; HARRISON L.C. Emerging evidence that molecules expressed by mammalian tissue grafts are recognized by the innate immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 71, n. 3, p. 401-409, 2002.

FRÖHLICH, J. K.; BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; JANOVIK, V.; FROEDER, A. L. F.; ATHAYDE, M. L. 2010. Compostos isolados de *Jatropha isabelli* (müell arg) como atividade gastroprotetora. *Saúde (Santa Maria)*, v. 36, n. 2, 1928.

FUNKHOUSER, E. M.; SHARP, G. B. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer*, v. 76, p. 1116-1119, 1995.

GAFNER, S.; BERGERON, C. The challenges of chemical stability testing of herbal extracts in finished products using state-of-the-art analytical methodologies. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 1, n. 2, p. 203-215, 2005.

GANDINI, S.; SERA, F.; CATTARUZZA, M.S.; PASQUINI, P.; ZANETTI, R.; MASINI, C.; BOYLE, P.; MELCHI, C.F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European Journal of Cancer*, v. 41, p. 2040-2059, 2005.

GARBE, C. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma - In: *6th World Congress on Melanoma - Book of abstracts*. Vancouver, p.46. 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 9a ed., Rio de Janeiro Guanabara Koogan, p. 1014, 1997.

GEBHARD, B.; GNANT, M.; SCHÜTZ, G. Different transendothelial migration behaviour pattern of blood monocytes derived from patients with benign and malignant diseases of the breast. *Anticancer Research*, v. 20, p. 4599-4604, 2000.

GELLER, M.; KRYMCHANTOWSKI, A. V.; STEINBRUCH, M.; CUNHA, K. S.; RIBEIRO, M. G.; OLIVEIRA, L.; OZERI, D.; DAHER, J. P. L. Utilização do diclofenaco na prática clínica: revisão das evidências terapêuticas e ações farmacológicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, v. 10, n. 1, p. 29-38, 2012.

GIAVAZZI, R.; DECIO, A. Syngeneic murine metastasis models: B16 melanoma. *Methods in Molecular Biology*, v. 1070, p. 131-140, 2014.

GIOVANELLA, B. C.; FOGH, J. The nude mouse in cancer research. *Advances in Cancer Research*, v. 44, p. 69-120, 1985.

GONG, J.H.; RATKAY, L.G.; WATERFIELD, J.D.; CLARK-LEWIS, I. An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 186, p. 131-137, 1997.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12ª Edição. New York: Editora McGraw-Hill, 92 p. 1996.

GORDON, S. The macrophage: Past, present and future. *European Journal of Immunology*, v. 37, p. 9-17, 2007.

GOULART, S.; MORITZ, M.I.G.; LANG, K.L.; LIZ, R.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S.. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 346-353, 2007.

GOUVEIA, M. A. Obtenção e caracterização de dispersões sólidas de nimesulida. Dissertação de Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 32, 2011.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, v. 445, p. 851-857, 2007.

GRIFFITH, J.W.; SOKOL, C.L.; LUSTER, A.D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual Review of Immunology*, v. 32, p. 659-702, 2014.

GUEVARA, I.; IWANEJKO, J.; DEMBIŃSKA-KIEĆ, A.; PANKIEWICZ, J.; WANAT, A.; ANNA, P.; GOŁABEK, I.; BARTUŚ, S.; MALCZEWSKA-MALEC, M.; SZCZUDLIK A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta*, 274 (2):177-88, 1998.

GULLO, V. P.; McALPINE, J.; LAM, K. S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 523- 531. 2006.

GÜNTNER, C., BARRA, C., CESIO, M.V., DELLACASSA, E., FERRANDO, L., FERREIRA, F., GARCÍA, C., GONZÁLEZ, G., HEINZEN, H., LLORET, A.,

LORENZO, D., MENÉNDEZ, P., PAZ, D., SOULE, S., VÁZQUEZ, A., MOYNA, P. Antioxidant properties of *Solidago chilensis* L. flavonoids. II Wocmap Congress Medicinal And Aromatic Plants. 1999.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HADDAD, C. F. Trastuzumab no câncer de mama. *Femina*, v. 38, n. 2, p. 73-77, 2010.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; v. 445, p. 214-24, 2006.

HARMEY, J.H.; BUCANA, C.D.; LU, W.; BYRNE, A.M.; MCDONNELL, S.; LYNCH, C. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *International Journal of Cancer*, v. 101, p. 415-22, 2002.

HASIMA, N.; AGGARWAL, B. B. Cancer-linked targets modulated by curcumin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 3, n. 4, p. 328-351. 2012.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, v. 32, n. 7, p. 1141-1148. 1983.

HAZELDINE, J.; HAMPSON, P.; LORD, J. M. Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Cell aging*, v. 11, p. 751-9, 2012.

HELLER, D. S.; HAMEED, M.; CRACCHIOLO, B. WIEDERKEHR, M.; SCOTT, D.; SKURNICK, J.; AMMAR, N.; LAMBERT, W. C. 2003. Presence and quantification of macrophages in squamous cell carcinoma of the cervix. *International Journal of Gynecology Cancer*, 13: 67-70.

HEPPNER, G.H.; MILLER, F.R.; SHEKHAR, P.M. 2000. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2: 331-334.

HIRANO, T., AKIRA, S., TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology Today*, v. 11, p. 443-449, 1990.

HIRANO T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*, v. 86, n. 7, p. 717-30, 2010.

HOMSI, J.; KASHANI-SABET, M.; JANE, L. Cutaneous Melanoma: Prognostic Factors. *Cancer Control*, v. 12, n. 4, p. 223-229, 2005.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, v. 16, p. 448–457, 2015.

HUO, M.; CUI, X.; XUE, J.; CHI, G.; GAO, R.; DENG, X.; GUAN, S.; WEI, J.; SOROMU, L. W.; FENG, H.; WANG, D. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *Journal of Surgical Research*, v. 180, p. 47-54, 2013.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sciences*, v. 69. p. 2911–2919, 2001.

IKEDA, K.; COX, S.; EMERY, P. Aspects of early arthritis. Biological therapy in early arthritis – overtreatment or the way to go? *Arthritis Research & Therapy*, v. 9, n. 1, p. 211-221, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, v. 122, n. 4, p. 291-294, 2002.

ISSA, A.Y.; VOLATE, S. R.; WARGOVICH, M.J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: new directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, n. 5, p. 405-419, 2006.

IWAMOTO, L.H.; RUIZ, A.L.T.G.; FOGLIO, M.A.; DE CARVALHO, J.E.; RODRIGUES, R.A.F.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; MONTEIRO, P.A.; SOUSA, I.M.O. Anticancer and antiinflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 8, p. 27-31, 2015.

JANEWAY, C.A. JR. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, v. 54, p. 1-13, 1989

JARAMILLO, M. A; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). American Journal of Botany, v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.

JARAMILLO, M. A; CALLEJAS, R.; DAVIDSON, C.; SMITH, J. F.; STEVENS, A. C.; TEPE, E. J. A Phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron psbJ–petA. Systematic Botany, v. 33, n. 4, p. 647-660, 2008.

JIANG, Y.; BELLER, D. I.; FRENDEL, G.; GRAVES, D.T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. Journal of Immunology, v. 148, n. 8, p. 2423-2428, 1992.

JONG, Y.; COMISKEY, M.; KALLED, S. L. Chronic murine colitis is dependent on the CD154/CD40 pathway and can be attenuated by anti-CD154 administration. Gastroenterology, v. 119, p. 715–723. 2000

KAMANZI ATINDEHOU, K.; SCHMID, C.; BRUN, R.; KONE, M. W.; TRAORE, D. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d'Ivoire. Journal of Ethnopharmacology, v. 90, n. 2-3, p. 221-227, 2004.

KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. Tradução: da 10ª Edição, Porto Alegre: AMGH, p. 1046, 2010.

KAVITA, U., MIZEL, S. B. Differential sensitivity of interleukin-1 and -precursor proteins to cleavage by calpain, a calcium-dependent protease. The Journal of Biological Chemistry. v.270, p. 27758–27765, 1995.

KELLY, L. M.; GONZÁLEZ, F. Phylogenetic relationships in Aristolochiaceae. Systemic Botanical. v.28, p. 236-249, 2003

KIENER, P.A., MORAN-DAVIS, P., RANKIN, B.M., WAHL, A.F., ARUFFO. A.; HOLLENBAUGH, D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. Journal of Immunology, v. 155, p. 4917–4925, 1995.

KIJJOA, A. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Medica*, v. 39, n. 5, p. 85-87, 1980.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of câncer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 44:143-161

KOHARA, A.; SUZUKI, T.; HONMA, M.; OHWADA, T.; HAYASHI, M. Mutagenicity of aristolochic acid in the *M/lacZ* transgenic Mouse (MutaMouse). *Mutation Research*, v. 515, n. 1-2, p. 63-72, 2002.

KONG, J. M.; GOH, N. K.; CHIA, L. S.; CHIA, T. F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 24, n. 1, p. 7-21, 2003.

KOPANS, D.B. *Imagem da mama*/traduzido por Bertuol M. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda, p. 29-54. 2000

KORNBLUTH, R. S.; KEE, K.; RICHMAN, D. D. CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive beta-chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, p. 5205–5210, 1998.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R.B. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: current issues *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v. 52, n. 4, 2002.

LAI, L. H.; FU, Q. H.; LIU, Y.; JIANG, K.; GUO, Q. M.; CHEN, Q. Y.; YAN, B.; WANG, Q. Q.; SHEN, J. G. Piperine suppresses tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* in a 4T1 murine breast cancer model. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 33, p. 523-530, 2012.

LECCI, A., GIULIANI, S., TRAMONTANA, M., CARINI, F., MAGGI, C. A., Peripheral actions of thachykininis. *Neuropeptides*, v. 34, p. 303-313, 2000

LEITÃO, G. G. & KAPLAN, M.A.C. Química do gênero *Aristolochia*. *Revista Brasileira de Farmacologia*. v. 73, p. 65-75, 1992.

LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A.; ROCHE, V.F.; ZITO, S.W. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7ª Edição, Lippincott Williams & Wilkins, p.929-938, 2012.

LINDSTEIN, T., C. H. JUNE, J. A. LEDBETTER, G. STELLA; THOMPSON, C.B. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science*, v. 244, p. 339-343, 1989.

LISBOA, L. F. Tendências da incidência e da mortalidade do CA de mama nomunicípio de São Paulo. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 34, 2009.

LIZ, R.; VIGIL, S. V.G.; GOULART, S.; IZABEL, M.; MORITZ, G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. The Anti-Inflammatory Modulatory Role of *Solidago Chilensis* Meyen in the Murine Model of the Air Pouch. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 60, n. 4, p. 515-521. 2008.

LOCK, C.; HERMANS, G.; PEDOTTI, R.; BRENDOLAN, A.; SCHADT, E. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis, *Nature Medicine*. v. 8, p. 500-508, 2002.

LOPES, A. P.; BAGATELA, B. S.; ROSA, P. C.; NANAYAKKARA, D. N. P.; CARVALHO, J. C. T.; MAISTRO, E. L. Antioxidant and cytotoxic effects of crude extract, fractions and 4-nerolidylcatechol from aerial parts of *Pothomorphe umbellata* L. (Piperaceae). *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-5. 2013.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. p.512, 2002

LOTZ, M.; JIRIK, F.; KABOURIDIS, P. B cell stimulating factor-2/interleukin 6 is a co-stimulant for human thymocytes and T- lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. v. 167, p. 1253-58. 1988

LOTZE, M.T., ZEH, H.J., RUBARTELLI, A., SPARVERO, L.J., AMOSCATO, A.A., WASHBURN, N.R., DEVERA, M.E., LIANG, X., TÖR, M., BILLIAR, T. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/ oxidation regulate immunity. *Immunological Reviews*, v. 220, p. 60-81, 2007.

MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: na evolutionary perspective. *Drug Discovery Today*, v. 14, n. 23-24, p. 1.136- 1.142, 2009.

MACHADO, T.B.; LEAL, I. C. R.; KUSTER, R. M.; AMARAL, A. C. F.; KOKIS, V.; SILVA, M. G. & SANTOS, K. R. N. Brazilian Phytopharmaceuticals Evaluation against Hospital Bacteria. *Phytotherapy Research*, v. 19, p. 519-525, 2005.

MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X. Chalcone-flavone tetramer and biflavones from *Aristolochia ridicula*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 669-674, 2005.

MAINI, R. N.; TAYLOR, P. C.; SZECHINSKI, J.; PAVELKA, K.; BRÖLL, J.; BALINT, G. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in european patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis & Rheumatism*, v. 54, n. 9, p. 2817-2829, 2006.

MANTOVANI, A.; BOTTAZZI, B.; COLOTTA, F.; SOZZANI, S.; RUCO, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today*, v. 13, n. 7, p. 265-270, 1992.

MARINONI, B.; CERIBELLI, A.; MASSAROTTI, M.S.; SELMI, C. Th17 axis in psoriatic disease: pathogenetic and therapeutic implications. *Autoimmunity Highlights*, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2014.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology*, v. 12, p. 991-1045, 1994.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. JR. Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, v. 343, p. 338-344, 2000.

MENDONÇA, M. A. O.; TAVARES-MURTA, B.M.; BACHIN, E.S.; DAVI, L. B.; MURTA, E. Relationship between risk factors and tumor stage in breast cancer patients in a university hospital, *European Journal of Gynaecological Oncology*, v. 39, n. 1, p. 80, 2008.

MESQUITA, J. R. D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVIEL, W. M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. *Sinopse de Reumatologia*, São Paulo, p. 66 – 81, 2008.

MEYERS, M.L.; BALCH, C.M. Diagnosis and treatment of metastatic melanoma. *Quality Medical Publishing*, v. 23, p. 325-372, 1998.

MOILANEN, E., VAPPATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Annals of Medicine*, v. 27, p. 359-367, 1995.

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

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. de F.; DUARTE, A. L.B. P. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). *Revista temas de reumatologia clínica*, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MONKS, N.R., BORDIGNON, S., FERRAZ, A., MACHADO, K.R., FARIA, D.H., LOPES, R.M., MONDIN, C.A., SOUZA, I.C.C., LIMA, M.F.S., ROCHA, A.B., SCHWARTSMANN, G. Anti-tumour Screening of Brazilian Plants. *Pharmaceutical Biology*, v. 40, p. 1-14, 2002.

MOORE, K.W.; O'GARRA, A.; de WALL MALEFYT, R.; VIEIRA, P. MOSMANN, T.R. Interleukin-10. *Annual Review of Immunology*. v. 11, p. 165-90, 1993.

MOREL, A.F., DIAS, G.O., PORTO C., SIMIONATTO, E., STUKER, C.Z., DACOL, I.I., Antimicrobial activity of extratives do *Solidago microglossa*. *Fitoterapia*, v. 77, p. 453-455, 2006.

MORRISON, S.F., NAKAMURA, K., MADDEN, C.J. Central control of thermogenesis in mammals. *Experimental Physiology*. v. 93, n. 7, p. 773-797, 2008.

MORTON, D.L. Current management of malignant melanoma. *Annals of Surgery*, v. 212, p. 123-4, 1990.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1- 2, p. 55-63, 1983.

MOSMANN, T.R. Properties and functions of interleukin-10. *Advances in Immunology*, v. 56, p. 1, 1994.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 5ª Edição, Elsevier, Rio de Janeiro. RJ, 2006.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, v. 95, n. 10, p. 3032-3043, 2000.

NAGY, G. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunology Letters*, v. 111, n. 1, p. 1-5, 2007.

NAMIKI, M.; KAWASHIMA, S.; YAMASHITA, T.; OZAKI, M.; HIRASE, T.; ISHIDA, T.; INOUE, N.; HIRATA, K.; MATSUKAWA, A.; MORISHITA, R.; KANEDA, Y.; YOKOYAMA, M. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 22, p. 115–120, 2002.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase *The Journal of Physiology*, v. 59, p. 783-787, 1997.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. The influence of natural products upon drugs *Discovery. Natural Products Reports*, v. 17, p. 215-234, 2000.

NICHOLLS, S. J.; HAZEN, S. L. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of coronary artery disease. *Japanese journal of infectious diseases Impact & Description*, v. 57, p. 21-22, 2004.

NUKI, G.; BRESNIHAN, B.; BEAR, M. B.; MCCABE, D. Long-term safety and maintenance of clinical improvement following treatment with anakinra (recombinant human interleukin-1 receptor antagonist) in patients with rheumatoid arthritis: extension phase of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatology*, v. 46, n. 11, p. 2838-2846, 2002.

NUÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L.A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry*, v. 66, n. 9, p. 1017-1025, 2005.

NURNBERGER, W.; PLATONOV, A.; STANNIGEL, H.; BELOBORODOV, V.B.; MICHELMANN, I.; VON KRIES, R. Definition of a new score for severity of generalized *Neisseria meningitidis* infection. *European Journal of Pediatrics*, v. 154, n. 11, p. 896-900, 1995.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P.L.; VIEIRA, P.; GOLDFELD, A.E. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 114, n. 10, p. 1372-1378, 2004

OGATA, H.; TAKEYA, M.; YOSHIMURA, T.; TAKAGI, K.; TAKAHASHI, K. The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the pathogenesis of collagen induced arthritis in rats. *The Journal of Pathology*, v. 182, n. 1, p. 106-114, 1997.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. *Farmacognosia*. 2ª Edição, Atheneu. Rio de Janeiro. RJ, 2003.

OLLILA, D.W.; HSUEH, E.C.; STERN, S.L.; MORTON, D.L. Metastasectomy for recurrent stage IV melanoma. *Journal of Surgical Oncology*, v. 71, p. 209-213, 1999.

OPPMANN, B., LESLEY, R., BLOM, B., TIMANS, J.C., XU, Y., HUNTE, B., VEGA, F., YU, N., WANG, J., SINGH, K. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, v. 13, p. 715–725, 2000.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiology Reviews*, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PANCROTE, C. G. Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados pirrólicos com potencial atividade anti-inflamatória. Dissertação de doutorado em fármaco e medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PARRONCHI, P.; ROMAGNANI, P.; ANNUNZIATO, F.; SAMPOGNARO, S.; BECCHIO, A.; GIANNARINI, L. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *American Journal of Pathology*, v. 150, p. 823–832. 1997

PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 17, p. 321–327, 2006.

PATTERSON, C. E., LUM, H. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium*, v. 8, p. 75-105, 2001.

PAWAR, V.; GOHIL, V.; TAMBOLI, R.; GIRIDHAR, R.; YADAV, M.R. Cartilage targeted chemical delivery of naproxen and ibuprofen for the treatment of arthritis. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, v. 4, n. 1, p. 10-11, 2012.

PERAZZO, F. F.; SOUZA, G. H. B.; LOPES, W.; CARDOSO, L. G. V; CARVALHO, J. C. T.; NANAYAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, n. 2, p. 215-220, 2005.

PETER, I.; MEZZACASA, A.; LEDONNE, P.; DUMMER, R.; HEMMI, S. Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91- M3. *Melanoma Research*, v. 11, p. 21-30, 2001.

PETROVIC-RACKOV, L.; PEJNOVIC, N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, v. 25, p. 448–452. 2006

PINTO, N. C.; MACHADO, D. C.; DA SILVA, J. M.; CONEGUNDES, J. L.; GUALBERTO, A. C.; GAMEIRO, J.; MOREIRA, C. L.; CASTAÑON, M. C.; SCIO, E. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 15, n. 173, p. 330-337. 2015

PLOHMANN, B., BADER, G., HILLER, K., FRANZ, G. Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins. *Pharmazie*, v. 52, p. 953-957, 1997.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*, v. 39, p. 1–20, 2001.

RATH, P. C.; AGGARWAL, B. B. TNF-induced signaling in apoptosis. *Journal of Clinical Immunology*, v. 19, p. 350–364, 1999.

REIMUND, J.M., WITTERSHEIM, C., DUMONT, S., MULLER, C.D, KENNEY, J.S., BAUMANN, R., POINDRON, P.; DUCLOS, B., Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut*, v. 39, n. 5, p. 684-689, 1996.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 387, p. 111–118, 2000.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; BENINK, A. H.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. 2013. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; NELSON, H. Assay guidance manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and National Center for Advancing Translational Sciences. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Acesso em: 13 fev. 2016.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F.. *Virologia Veterinária*. 1ª Edição. Santa Maria, Rio Grande do Sul. Editora UFSM, 2007.

ROBAK, T.; GLADALSKA, A.; STEPIEN, H. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *European Cytokine Network*, v. 9, n. 2, p.145–154, 1998.

ROBBINS, S. S.; COTRAN, R. S. *Pathologic basis of diseases*. 7. ed. Philadelphia: Saunders, p. 1524, 2005.

ROBERT, I.S.; PATRICIA, C. C.; ALAN, K. L.; ALBERT, S.; BALDWIN, JR. Role of transcriptional activation of IB on mediation of imunossuppression by glucocorticoids. *Science*. v. 270, p. 283-286, 1995.

ROCHA e SILVA, M. A. A brief survey of history of inflammation. *Agents Actions*, v. 8, p. 45-49, 1979.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. A. Levantamento etnofarmacológico realizado entre um grupo de quilombolas do Brasil. *Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica*, v. 1, n. 2, p. 80-87, 2003.

RODRIGUES, E. R.; NOGUEIRA, N. G. P.; ZOLOCO, G. J. *Pothomorphe umbellata*: antifungal activity against strains of *Trichophyton rubrum*. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, v. 22, n. 3, p. 265-269, 2012.

RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. 2002. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 292, p. 869-873, 2002.

RODRIGUES, C. Uso do abatacepte em uma paciente com artrite psoriásica. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 3, p. 340-345, 2010.

ROERSCH, C. M. F. B. *Piper umbellatum* L.: a comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, v.131, n. 3. p. 522-537, 2010.

ROLLINS, B.J.; MORRISON, E.D.; STILES, C.D. 1988. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokinelike properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, n. 11, p. 3738-3742, 1988.

ROPKE, C. D. Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* na pele. CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA DA ABC, 14. *Anais*, São Paulo: Tec Art Editora, 1979.

ROPKE, C. D.; KANEKO, T. M.; RODRIGUES, R. M.; DA SILVA, V. V.; BARROS, S.; SAWADA, T. C.; KATO, M. J.; BARROS, S. B. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 249, p. 107-114, 2002.

ROPKE, C. D.; MEIRELLES, R. R., DA SILVA, V.; SAWADA, T. C.; BARROS, S. B. *Pothomorphe umbellata* extract prevents alpha-tocopherol depletion after UV-irradiation. *Photochemistry and Photobiology*, v. 78, p. 436-439, 2003.

ROPKE, C. D. SAWADA, T. C.; DA SILVA, V. V.; MICHALANY, N. S.; BARROS, S. B. M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 30, n. 3, p. 272-276, 2005.

ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in Neurosciences*, v. 23, p. 618–625, 2000.

SACOMAN, J. L.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G. M.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.41, n.5, p. 411-415, 2008.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. F.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 136, p. 504–510, 2011.

SCHMEDA-HIRSHMANN, G. A Labdan diterpene from *Solidago chilensis* roots. *Planta Medica*, v. 54, p. 179-180, 1988.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology*, v. 96, p. 41-101, 2007.

SENISKI, G. G. Análise do perfil de metilação do promotor do gene ADAM33 e sua correlação clínica com câncer de mama. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 2008.

SERHAN, C. N., CHIANG, N., VAN DYKE, T.E. Resolving Inflammation: Dual Anti-inflammatory and Pro-resolution Lipid Mediators. *Nature Reviews*, v. 8, p. 349-361, 2008.

SEUNG, J.B.; JONG-SILK, K.; FEKIK, R.J.; THOMAS, E.E.; MICHAEL, F.M.; SEONG-HO. L. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis and colon cancer cells. *Carcinogenesis*, v.25, p. 2425-2432, 2004.

SHELLACK, G. Farmacologia na prática clínica de saúde. Editora Fundamento, p.190, 2006.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, v. 18, p. 385-405, 2004.

SHUKLA, S.; SRIVASTAVA, R. S.; SHRIVASTAVA, S. K.; SODHI, A.; KUMAR, P. Synthesis, Molecular docking and Biological evaluation of 4 Cycloalkylidineamino 1, 2- Naphthoquinone Semicarbazones as Anticancer agents. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 2. n. 2, p. 1040-1046, 2012.

SICA, A.; SACCANI, A.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *International Immunopharmacology*, v. 2, p. 1045-1054, 2002.

SCHEINBERG, M. O infliximab no tratamento da artrite reumatóide: quando e como usar. *Hospital Albert Einstein, São Paulo*, v. 1, n. 1, p. 138-140, 2005.

SCHOTTELIUS, A. J.; BALDWIN, A. S. A role for transcription factor NF-B in intestinal inflammation. *International Journal of Colorectal Disease*, v. 14, p. 601-609, 1999.

SILVA JUNIOR I. F.; DE OLIVEIRA, R. G.; SOARES, I. M.; ALVIM, T. C.; ASCÊNCIO, S. D.; MARTINS, D, T, O. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 151, n. 1, p.137-43, 2014.

SILVA JUNIOR, I. F.; BALOGUN, S. O.; OLIVEIRA, R. G.; DAMAZO, A. S.; MARTINS, D. T. *Piper umbellatum* L.: A medicinal plant with gastric-ulcer protective and ulcer healing effects in experimental rodent models. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 4, n. 192 p. 123-131. 2016

SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 8ª Edição, p. 1325, 2010.

SILVA, V. V.; ROPKE, C.D.; de ALMEIDA, R.L.; MIRANDA, D.V.; KERA, C.Z.; RIVELLI, D.P.; SAWADA, T.C.; BARROS, S.B. 2005. Chemical stability and SPF determination of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolidylcatechol. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 303, n. 1-2, p. 125-31, 2005.

SILVA, V. V.; ROPKE, C. D. ; MIRANDA, D. V.; ALMEIDA, R. L.; SAWADA, T. C. H.; RIVELLI, D. P.; BARROS, S. B. M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* on UVB radiation-induced biomarkers involved in carcinogenesis of hairless mouse epidermis. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, v. 28, n. 2, p. 54-60, 2009.

SILVA, C. B.; ALBUQUERQUE, V.; LEITE, J. Qualidade de vida em pacientes portadoras de neoplasia mamária submetidas a tratamentos quimioterápicos. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 56, n. 2, p. 227-236, 2010.

SILVA, W. F.; CECÍLIO, S. G.; MAGALHÃES, C. L.; FERREIRA, J. M.; TÓTOLA, A. H.; DE MAGALHAES, J C. Combination of extracts from *Aristolochia cymbifera* with streptomycin as a potential antibacterial drug. *Springerplus*, v. 2, p. 430, 2013.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. 5ª Edição: Ed. Universidade/UFRGS. Porto Alegre. RS. p.173, 1998.

SINGLETERY, S. E.; CONNOLLY, J. L. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 56, n. 1, p. 37-47, 2006.

SIVEEN, K.S.; KUTTAN, G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunology Letters*, v. 123, p. 97-102, 2009.

SLINGLUFF JR, C.L.; FLAHERTY, K.; ROSENBERG ,S.A.; READ, P.W. Cutaneous Melanoma. In: DEVITA JR, V.T.; LAWRENCE, T.S.; ROSENBERG, S.A. 2011. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 9ª Edição, Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

SOARES, L. A. L., SOUZA, T. P. Extrato seco vegetal e produtos derivados. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPE, N. P. 2012. *Farmacognosia: coletânea científica*. Ouro Preto: UFOP, 339- 357p.

SOUZA, C. M. Carcinoma mamário murino 4t1: características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas e ensaios pré-clínicos com talidomida/carboplatina. Dissertação de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p.133, 2013.

SPOETTL, T.; HAUSMANN, M.; HERLYN, M.; GUNCKEL, M.; DIRMEIER, A.; FALK, W.; HERFARTH, H.; SCHOELMERICH, J.; ROGLER, G. Monocyte chemoattractant

protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 145, p. 190–199, 2006.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Research*, v. 47, p. 5590–5594, 1987.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors*. v. 3, p. 276-284, 2003.

SUNDBGREN-ANDERSSON, A.K.; OSTLUND, P.; BARTFAI, T. IL-6 is essential in TNF-alpha-induced fever. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 275, p. 2028-2034, 1998.

TAKEDA, K., AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.

TAN, P.; LUSCINKAS, F. W.; HONNER-VANNIASINKAM, S. Celular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. v. 17, p. 373-389, 1999.

TEDGUI, A., MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circulation Research*, v. 88, p. 877-887, 2001.

THAMBI, P. T.; KUZHIVELIL, B.; SABU, M. C.; JOLLY, C. I. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (L) R. Br. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 68, n. 3, p. 352-55, 2006.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock *General Pharmacology*, v. 29, n. 2, p. 159-166, 1997.

TORRES, L. M. B. ; ROQUE, N. F. ; AKISUE, M. K. Diterpenes from the roots of *Solidago microglossa*. *Revista Latinoamericana de Química*, v. 20, n. 2, p. 94-97, 1989.

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. *Pharmacognosy*. 11^a Edição. Macmillan Publishers, London, UK. p. 324-317, 1989.

UMAR, S.; UMAR, K.; SARWAR, A. H.; KHAN, A.; AHMAD, N.; AHMAD, S.; KATIYAR, C. K.; HUSAIN, S. A.; KHAN, H. A. *Boswellia serrata* extract attenuates

inflammatory mediators and oxidative stress in collagen induced arthritis. *Phytomedicine*, v. 21, n.6, p. 847-856, 2014

VAN DER VEEN, B. S.; DE WINTHER, M. P.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease *Antioxidans & Redox Signaling*. v. 11, n. 11, p. 2899-2937. 2009.

VARELLA, P. P. V. & FORTE, W. C. N. Cytokines: a review. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VERRI JR, W.A.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, F.Q.C.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*. v. 112, p. 116-138, 2006.

VILA, R., MUNDINA, M., TOMI, F., FURLÁN, R., ZACCHINO, S., CASANOVA, J., CAÑIGUERAL, S. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica*, v. 68, p. 164-167, 2002.

VOGT, A.; TAMEWITZ, A.; SKOKO, J.; SIKORSKI, R. P.; GIULIANO, A. K.; LAZO, J. S. The benzo[c]phenanthridine alkaloid, sanguinarine is a selective, cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 19078-19086, 2005.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M. S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales--matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 42, n. 2, p. 477-497, 2007.

WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Selective release of a processed form of interleukin 1. *Cytokine* v.6: p.597-601. 1994.

WATASE, I.; SUDO, H.; YAMASAKI, M.; SAITO, K. Regeneration of transformed *Ophiorrhiza pumila* plants producing camptothecin. *Plant Biotechnology Journal*, v. 21, p. 337-342, 2004.

WEBER, E., JAKOBS, G. Biological flora of central Europe: *Solidago gigantea* Aiton. *Flora*, v. 200, p. 109-118, 2005.

WEINLICH, G.; BITTERLICH, V.; FRITSCH, P.O.; ZELGER, B. Metallothionein overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A

prospective study on 520 patients. *British Journal of Dermatology*, v. 149, n. 3, p. 535-541, 2003.

WERB, Z.; GORDON, S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages *The Journal of Experimental Medicine*, v. 142, p. 346-360, 1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets control of neglected tropical diseases who pesticide evaluation scheme. Geneva: World Health Organization, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan, 2012.

WU, T. S.; DAMU, A. G.; SU, C. R.; KUO, P. C. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. *Natural Product Reports*, v. 21, p. 594–624, 2004.

YEAGER, M. P.; GUYRE, P.M.; MUNCK, A. U. Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injury. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. v. 48, n. 7, p. 799-813. 2004

YU, C. C. Abatacept in B7-1-Positive proteinuric kidney disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 369, p. 2416-2423, 2013.

ZHANG, R.; BRENNAN, M. L.; SHEN, Z.; MACPHERSON, J. C.; SCHMITT, D.; MOLEND, C. E. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 46116-46122, 2002.

ZIOLKOWSKA, M.; KOC, A.; LUSZCZYKIEWICZ, G.; KSIEZOPOLSKA-PIETRZAK, K.; KLIMCZAK, E.; CHWALINSKA-SADOWSKA, H. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *Journal of Immunology*, v. 164, p. 2832-2838, 2000.

ZHOU, S.; KOH, HWEE-LING.; GAO, Y.; GONG, ZHI-YUAN. & LEE, E. J. D. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Science*, v. 74, p. 935- 968, 2004.