



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara

*Avaliação da atividade
antiinflamatória, antitumoral e
antiangiogênica de compostos isolados
da planta *Alchornea glandulosa* e de
fungos endofíticos a ela relacionados*

Flávia Cristine Mascia Lopes

Araraquara-SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA, ANTITUMORAL
E ANTIANGIOGÊNICA DE COMPOSTOS ISOLADOS DA PLANTA
Alchornea glandulosa E DE FUNGOS ENDOFÍTICOS A ELA
RELACIONADOS**

FLÁVIA CRISTINE MASCIA LOPES

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA,
ÁREA DE IMUNOLOGIA

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Iracilda Zeppone Carlos

ARARAQUARA - SP

2008

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

L864a Lopes, Flávia Cristine Mascia
Avaliação da atividade antiinflamatória, antitumoral e antiangiogênica de compostos isolados da planta *Alchornea glândula* e de fungos endofíticos a ela relacionados / Flávia Cristine Mascia Lopes. – Araraquara, 2008.
164 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

1.Alchornea glandulosa. 2.Fungos endofíticos. 3.Produutos naturais.
4.Imunologia.. I.Carlos, Iracilda Zeppone, orient.. II.Título.

CDD 615.37

CAPES: 40300005

TERMO DE APROVAÇÃO

NOME DA AUTORA: Flávia Cristine Mascia Lopes

TÍTULO DO TRABALHO: Avaliação da atividade antiinflamatória, antitumoral e antiangiogênica de compostos isolados da planta *Alchornea glandulosa* e de fungos endofíticos a ela relacionados

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

PRESIDENTE E ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Iracilda Zeppone Carlos

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara

SEGUNDO EXAMINADOR: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

TERCEIRO EXAMINADOR: Prof^ª. Dr^ª. Angela Maria Victoriano de Campos Soares

INSTITUIÇÃO: Instituto de Biociências, UNESP- Botucatu

QUARTO EXAMINADOR: Prof^ª. Dr^ª. Beatriz Maria Machado de Medeiros

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara

QUINTO EXAMINADOR: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Odontologia, UNESP - Araraquara

ARARAQUARA, 26 de novembro de 2008.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara com auxílio de bolsa CNPq (nº 141321/2005-9). Parte da pesquisa foi realizada em Portugal, durante um estágio no exterior (PDEE/CAPES - nº 1008/07-2), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Raquel Soares do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

*Aos meus pais, Francisco e Clotilde,
agradeço o imenso apoio, exemplo, amor e incentivo
que tornaram possíveis todas as oportunidades da minha vida.
Esta é a nossa mais nova conquista!*

*Ao meu namorado, Cleo,
por todo amor, atenção, auxílio e companhia.
Obrigada por participar de todos os momentos da minha vida!*

*Agradeço à minha orientadora Prof. Dr. Iracilda Zeppone Carlos,
por ter acreditado em meu potencial.*

AGRADECIMENTO A DEUS

Senhor!

Creio na força do Espírito Santo e de Jesus Cristo.

Creio no coração de Maria, um lugar seguro,
onde repouso o meu espírito e o meu coração...

Creio em ti Pai,
que me levas ao colo em muitas batalhas da minha vida.

Ajuda-me a seguir-te
e a seguir-te com humildade, doçura e paciência.

Faz com que eu saiba aceitar os caminhos
que me destinaste.

Pai, por tudo muito obrigado.

Idalina Azevedo (S. Martinho de Fornelo - Portugal)

Agradecimentos

Às Professoras: Dr^a. Vanderlan Bolzani, Dr^a. Dulce Silva e Dr^a. Angela Araújo pelo auxílio e incentivo durante a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Lucas Colombo pelos ensinamentos em relação às células tumorais e pelos momentos especiais durante a sua permanência no Brasil.

À Prof^a. Dr^a. Raquel Soares e à Prof^a. Dr^a. Isabel Azevedo por terem me possibilitado um enorme aprendizado no exterior.

À Prof^a. Dr^a. Susana David por todo o apoio que nos proporcionou em Portugal e pelos inesquecíveis momentos de amizade. Saudades...

Ao Dr. Luis Otávio Regasini pela sua constante ajuda.

A todos os membros da banca pelas valiosas sugestões.

A Marisa Placeres pelo valioso apoio e amizade desde os tempos de estágio de treinamento.

A Carolina Rabal pela constante colaboração durante o cultivo dos fungos endofíticos.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara... nunca me esquecerei dos ótimos momentos que tivemos!

Aos amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade do Porto - Portugal, pela ajuda e amizade. Terei sempre ótimas lembranças dos dias que passamos juntos no laboratório. Espero reencontrar vocês um dia...

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara por terem sempre me auxiliado. Obrigada pela grande amizade!

Às funcionárias da pós-graduação, Cláudia, Sônia, Laura... por toda a ajuda e atenção.

A todos os meus professores do curso de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, por terem contribuído com a minha formação.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, por estarem sempre dispostos a cooperar.

A toda minha família, pelo incentivo e convivência.

Ao Projeto Biota- FAPESP.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estágio no exterior - PDEE.

E a todos aqueles que sempre me ajudaram na realização deste trabalho. Muito obrigada!

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir a pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos"

Isaac Newton (1642 - 1727)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
RESUMO	
ABSTRACT	
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Plantas medicinais – passado, presente e futuro	6
2.2. A planta <i>Alchornea glandulosa</i>	9
2.3. Fungos endofíticos	12
2.4. Imunidade inata, inflamação e câncer	14
2.5. Angiogênese.....	22
III. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivos gerais	28
3.2. Objetivos específicos	28
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Etapa botânica	31
4.1.1. Coleta e identificação do material botânico	31
4.2. Etapa química	31
4.2.1. Obtenção da fração e de compostos isolados da planta <i>A. glandulosa</i>	31

4.2.2. Obtenção dos extratos acetato de etila a partir de fungos endofíticos isolados das folhas de <i>A. glandulosa</i>	33
4.2.2.1. Obtenção da cepa fúngica.....	34
4.2.2.2. Repique das linhagens fúngicas para crescimento em meio de cultura líquido	36
4.2.2.3. Obtenção dos extratos acetato de etila das culturas.....	36
4.2.2.4. Preparo das amostras.....	36
4.3. Etapa biológica.....	37
4.3.1. Linhagens celulares.....	37
4.3.1.1. Células LP07.....	37
4.3.1.2. Células LM2.....	37
4.3.1.3. Culturas celulares.....	38
4.3.2. Animais	38
4.3.3. Testes <i>in vitro</i>	38
4.3.3.1. Obtenção dos macrófagos peritoneais	38
4.3.3.2. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais	39
4.3.3.3. Ensaio de viabilidade dos macrófagos	40
4.3.3.4. Determinação da produção de NO	41
4.3.3.5. Determinação da inibição da produção de NO.....	42
4.3.3.6. Determinação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12.....	42
4.3.3.7. Cálculo da porcentagem de inibição	43

4.3.3.8. Determinação da atividade citotóxica dos compostos nas linhagens tumorais murinas LM2 e LP07.....	44
4.3.3.9. Avaliação da angiogênese.....	45
4.3.3.9.1. Células.....	45
4.3.3.9.2. Ensaio de viabilidade das células HUVEC	45
4.3.3.9.3. Ensaio de proliferação com BrdU.....	45
4.3.3.9.4. Avaliação da apoptose através da técnica de TUNEL ..	46
4.3.3.9.5. Ensaio de invasão.....	47
4.3.3.9.6. Avaliação da formação de estruturas tipo capilares pelas células HUVEC	48
4.3.3.9.7. Extração das proteínas de células HUVEC tratadas com os compostos.....	48
4.3.3.9.8. Quantificação das proteínas.....	49
4.3.3.9.9. Determinação da atividade do NFκB.....	49
4.3.4. Ensaio <i>in vivo</i>	50
4.3.4.1. Inoculação das células tumorais LM2 e LP07 nos camundongos.....	50
4.3.4.2. Inoculação intratumoral da fração acetato de etila da planta <i>A. glandulosa</i> e dos extratos dos fungos endofíticos.....	50
4.3.4.3. Obtenção dos tumores e avaliação do crescimento tumoral.....	51
4.4. Análise estatística.....	52
4.5. Tratamento e descarte de resíduos.....	52
4.6. Bioética.....	52
V. RESULTADOS	53

5.1. Avaliação da viabilidade dos macrófagos.....	54
5.2. Determinação da produção/ inibição de NO.....	57
5.3. Determinação da produção/inibição das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12.....	62
5.4. Determinação da atividade citotóxica dos compostos nas linhagens tumorais murinas LM2 e LP07.....	80
5.5. Avaliação da angiogênese.....	81
5.5.1. Ensaio de viabilidade das células HUVEC	82
5.5.2. Ensaio de proliferação	83
5.5.3. Avaliação da apoptose através da técnica de TUNEL.....	86
5.5.4. Ensaio de invasão.....	89
5.5.5. Avaliação da formação de estruturas tipo capilares pelas células HUVEC	90
5.5.6. Extração e quantificação das proteínas de células HUVEC tratadas com a fração acetato de etila de <i>A. glandulosa</i> e com o alcalóide pteroginidina	93
5.5.7. Determinação da atividade do NF κ B.....	93
5.6. Ensaio <i>in vivo</i>	94
5.6.1. Avaliação do crescimento tumoral.....	94
VI. DISCUSSÃO	97
VII. CONCLUSÕES	126
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações dos extratos, da fração e das substâncias puras utilizadas nos ensaios de determinação de NO e citocinas e determinadas pela técnica de MTT.....	57
Tabela 2. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos na produção de NO em macrófagos não estimulados por LPS.....	58
Tabela 3. Porcentagem de inibição da produção de NO em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos.....	61
Tabela 4. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos na produção de TNF- α em macrófagos não estimulados por LPS.....	63
Tabela 5. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos na produção de IL-1 β em macrófagos não estimulados por LPS.....	64
Tabela 6. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos na produção de IL-6 em macrófagos não estimulados por LPS.....	65
Tabela 7. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos na produção de IL-12 em macrófagos não estimulados por LPS.....	66
Tabela 8. Porcentagem de inibição da produção de TNF- α em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos.....	75
Tabela 9. Porcentagem de inibição da produção de IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos.....	76
Tabela 10. Porcentagem de inibição da produção de IL-6 em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos.....	77

Tabela 11. Porcentagem de inibição da produção de IL-12 em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta <i>A. glandulosa</i> e de fungos endofíticos.....	78
Tabela 12. Ordem de potencial antiinflamatório de cada composto avaliado através da média dos valores de porcentagem de inibição nos ensaios de NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12.....	80
Tabela 13. Determinação da atividade citotóxica de compostos isolados através da técnica de MTT em células da linhagem LM2 (adenocarcinoma de mama) e LP07 (adenocarcinoma de pulmão).....	81
Tabela 14. Concentrações dos compostos utilizados nos ensaios de angiogênese.....	83
Tabela 15. Quantificação das proteínas extraídas de células HUVEC.....	93
Tabela 16. Variações no peso corporal, peso do tumor extraído e volume do tumor extraído em grupos de animais Balb/c portadores de tumores do tipo LM2 e tratados com injeção intratumoral da fração acetato de etila da planta <i>A. glandulosa</i> e com os extratos dos fungos endofíticos ALG-A, ALG-02 e ALG-03.....	95
Tabela 17. Variações no peso corporal, peso do tumor extraído e volume do tumor extraído em grupos de animais Balb/c portadores de tumores do tipo LP07 e tratados com injeção intratumoral da fração acetato de etila da planta <i>A. glandulosa</i> e com os extratos dos fungos endofíticos ALG-A, ALG-02 e ALG-03.....	96
Tabela 18. Avaliação da taxa de crescimento dos tumores do tipo LM2 e LP07 em grupos de animais Balb/c tratados com injeção intratumoral da fração acetato de etila da planta <i>A. glandulosa</i> e com os extratos dos fungos endofíticos ALG-A, ALG-02 e ALG-03.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Alchornea glandulosa</i> . (A) árvore, (B) folhas, (C) frutos, (D) sementes, (E) casca e (F) madeira.....	11
Figura 2. Reparo tecidual versus crescimento tumoral invasivo.....	21
Figura 3. Angiogênese e a propagação de tumores.....	22
Figura 4. Esquema representativo do processo de angiogênese	25
Figura 5. Estruturas moleculares de substâncias obtidas de <i>Alchornea glandulosa</i>	33
Figura 6. Fungos endofíticos isolados das folhas da planta <i>Alchornea glandulosa</i> e codificados como ALG-A, ALG-02 e ALG-03	35
Figura 7. Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados e não estimulados por LPS na presença de diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03.....	55
Figura 8. Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados e não estimulados por LPS na presença de diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de <i>A. glandulosa</i> (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina).....	56
Figura 9. Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição da produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS	59
Figura 10. Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de <i>A. glandulosa</i> (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS	60
Figura 11. Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição da produção de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS.....	67

- Figura 12.** Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS 68
- Figura 13.** Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição da produção de IL-1 β em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS 69
- Figura 14.** Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de IL-1 β em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS 70
- Figura 15.** Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição da produção de IL-6 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS 71
- Figura 16.** Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de IL-6 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS..... 72
- Figura 17.** Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição da produção de IL-12 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS 73
- Figura 18.** Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de IL-12 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS..... 74
- Figura 19.** Efeitos da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50 μ g/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100 μ g/mL), da afzelina (50 μ g/mL) e da pteroginidina (1,56 μ g/mL) na viabilidade das células HUVEC avaliadas pela técnica de MTT..... 83

- Figura 20.** Efeitos da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) na proliferação das células HUVEC avaliadas pela técnica de BrdU..... 84
- Figura 21.** Fotomicrografias da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) obtidas através da técnica de BrdU..... 85
- Figura 22.** Efeitos da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) na apoptose das células HUVEC avaliadas pela técnica de TUNEL. 86
- Figura 23.** Fotomicrografias do controle (meio M199), da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL) e do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL) obtidas através da técnica de TUNEL em microscópio de fluorescência (aumento de 200X) 87
- Figura 24.** Fotomicrografias da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) obtidas através da técnica de TUNEL em microscópio de fluorescência (aumento de 200X)..... 88
- Figura 25.** Efeitos da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) na capacidade invasiva das células HUVEC em câmara dupla com matrigel..... 89
- Figura 26.** Semiquantificação das estruturas tipo capilares utilizando-se células HUVEC tratadas com a fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL)..... 91
- Figura 27.** Formação de estruturas tipo capilares em culturas de células HUVEC após o tratamento com a fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), com o extrato de

fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), com a afzelina (50µg/mL) e com a pteroginidina (1,56µg/mL).....	92
Figura 28. Efeitos da fração acetato de etila de <i>Alchornea glandulosa</i> (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) na ativação da subunidade p50 do NFκB em células HUVEC.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

AP-1: proteína ativadora-1

bFGF: fator de crescimento fibroblástico básico

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

CE: células endoteliais

CLAE/UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta

DMSO: dimetilsulfóxido

DAB: diaminobenzidina

DAPI: 4',6'-diamino-2-fenilindol

DNA: ácido desoxiribonucléico

ECGS: "Endothelial cell growth supplement"

ELISA: "Enzyme linked immunosorbent assay"

FBS: soro fetal bovino

GM-CSF: fator estimulador de colônias granulocíticas e monocíticas

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HIV-1: vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HUVEC: células endoteliais de veia umbilical humana

IC₅₀: concentração inibitória para 50% de células

IFN- γ : interferon-gama

IL-1: interleucina-1

IL-2: interleucina-2

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

IL-12: interleucina-12

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

LM2: linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino

LP07: linhagem tumoral de adenocarcinoma de pulmão murino

LPS: lipopolissacarídeo

MEM: “Minimal Essential Medium”

MMPs: matriz metaloproteinases

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio

NaNO₂: nitrito de sódio

NF κ B: Fator nuclear κ B

NK: células “natural killer”

NO: óxido nítrico

NO₂⁻: nitrito

NOS: óxido nítrico sintase

O₂⁻: ânion superóxido

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONOO⁻: peroxinitrito

ONOOH: ácido peroxinitroso

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PBS-T: solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween-20

PBS-FBS: solução salina tamponada com fosfato contendo 10% de soro fetal bovino

PBMNC: células mononucleares de sangue periférico

PDA: “Potato Dextrose Agar”

PDB: “Potato Dextrose Broth”

PMA: forbol miristato acetato/ “phorbol myristate acetate”

RPMI-1640: “Roswell Park Memorial Institute” (meio de cultura – série 1640)

Sn: sinomenina

Sq: esqualamina

ssDNA: ácido desoxiribonucléico monofilamentado

TNF- α : fator de necrose tumoral - alfa

TUNEL: “terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling”

UV: ultra-violeta



RESUMO

Produtos naturais têm contribuído intensamente para o desenvolvimento da terapêutica moderna. As plantas produzem um vasto número de substâncias, que em estado natural ou após sofrerem transformações químicas, possuem diversas atividades farmacológicas. Fungos endofíticos, organismos que vivem no interior das plantas, também podem representar novas fontes de produtos biologicamente ativos. Atualmente, a relação causal entre inflamação, imunidade inata e câncer é largamente aceita. O envolvimento de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO) e citocinas, gerados por macrófagos ativados, na patogênese das doenças inflamatórias já está bem estabelecido. Além disso, a inibição da angiogênese tem sido reconhecida como uma promissora abordagem terapêutica para o controle do crescimento tumoral, das metástases e das doenças inflamatórias crônicas. *Alchornea glandulosa* Poepp & Endl. (Euphorbiaceae) é uma planta com conhecida atividade antiinflamatória que está distribuída do sudeste ao sul do Brasil, principalmente na Mata Atlântica e no Cerrado. O potencial antiinflamatório, antitumoral e antiangiogênico dos compostos obtidos a partir da planta (fração acetato de etila e os compostos puros isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) e de fungos endofíticos presentes no interior das suas folhas (extratos acetato de etila ALG-A, ALG-02 e ALG-03) foram estudados por meio de experimentos utilizando-se culturas de macrófagos murinos, linhagens tumorais murinas de câncer de mama (LM2) e pulmão (LP07) e culturas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Ensaio de determinação de óxido nítrico (reagente de Griess), citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 (ELISA), atividade citotóxica (MTT) e avaliação da taxa de inibição do crescimento de tumores tratados com injeção intratumoral *in vivo* foram utilizados na avaliação antiinflamatória e antitumoral. Testes de apoptose (TUNEL), proliferação (bromodeoxiuridina – BrdU), invasão (câmara dupla), formação de estruturas capilares (matrigel) e avaliação do fator de transcrição NF κ B (ELISA) foram realizados para a avaliação das diversas etapas da angiogênese. Os resultados demonstraram que todos os compostos testados exibem atividade antiinflamatória ao inibirem significativamente a produção do mediador inflamatório NO e das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 de maneira dose-dependente. O extrato de fungo endofítico ALG-02 apresentou o maior potencial antiinflamatório desta pesquisa, inibindo, aproximadamente, 100% da produção de NO, 98,71% da produção de TNF- α , 89,39% da produção de IL-1 β , 99,74% da produção de IL-6 e ainda 86,79% da produção de IL-12. O ácido gálico (IC₅₀=5,48 μ g/mL), o extrato de fungo endofítico ALG-03 (IC₅₀=9,37 μ g/mL) e a pteroginidina (IC₅₀=18,66 μ g/mL) foram fortemente citotóxicos às células tumorais de adenocarcinoma de mama (LM2). Enquanto que a afzelina (IC₅₀=2,31 μ g/mL), o ácido gálico (IC₅₀= 3,35 μ g/mL), o extrato de fungo endofítico ALG-02 (IC₅₀=7,87 μ g/mL) e a fração acetato de etila de *A. glandulosa* (IC₅₀=10,15 μ g/mL), demonstraram possuir uma potente atividade citotóxica em relação às células de adenocarcinoma de pulmão (LP07). *In vivo*, a fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e o extrato do fungo endofítico ALG-02 puderam fortemente inibir o crescimento tumoral tanto de tumores de mama tipo LM2 quanto de tumores de pulmão do tipo LP07, sendo que o extrato do fungo endofítico ALG-03 também é capaz de inibir intensamente o crescimento tumoral induzido pelas células LP07. Nos ensaios de angiogênese, a fração acetato de etila de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02 e os compostos puros afzelina e pteroginidina diminuíram significativamente a proliferação das células HUVEC, sendo que o alcalóide pteroginidina induziu um decréscimo de 8 vezes na porcentagem de proliferação das células endoteliais. Além disso, a fração e a pteroginidina causaram um grande aumento na taxa de apoptose das células HUVEC, aproximadamente 19 e 14 vezes o valor do controle, respectivamente. Houve ainda um decréscimo na capacidade

invasiva das células HUVEC tratadas com a fração, com o extrato ALG-02 e com os compostos afzelina e pteroginidina, sendo que a fração e a pteroginidina causaram uma inibição mais efetiva, aproximadamente 7 e 24 vezes maior do que o controle. É importante ressaltar também que a fração, o extrato ALG-02, a afzelina e a pteroginidina foram capazes de prevenir a formação de estruturas tipo capilares em matrigel. A fração, o extrato ALG-02 e a pteroginidina reduziram drasticamente o número dessas estruturas, indicando que esses compostos podem fortemente interromper a formação dos vasos. Foi ainda avaliado o possível mecanismo de ação através do qual estariam agindo os compostos que exibiram alta atividade antiangiogênica, assim, comprovou-se que a fração e a pteroginidina eram capazes de inibir a atividade do NFκB nas células endoteliais. Desse modo, ficou demonstrado que os compostos testados podem bloquear o crescimento tumoral através da supressão do desenvolvimento dos vasos sanguíneos, sendo potenciais agentes antitumorais. Esses resultados enfatizam ainda o potencial uso desses compostos em doenças dependentes de angiogênese, especialmente no tratamento e prevenção do câncer. Portanto, tanto os compostos obtidos da planta quanto os extratos de fungos endofíticos exibiram diversas atividades biológicas, sejam elas, antiinflamatórias, antitumorais ou antiangiogênicas. A fração de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02, o alcalóide pteroginidina e o flavonóide afzelina demonstram simultaneamente essas três atividades e podem ser considerados potencialmente úteis como novos medicamentos antitumorais direcionados ao processo inflamatório e angiogênico. Conseqüentemente, esse trabalho proporcionou uma melhor compreensão das ações farmacológicas da planta *A. glandulosa*, ressaltando a importância da biodiversidade e também contribuindo para o entendimento da relação entre fungos endofíticos e plantas medicinais.

□ **PALAVRAS-CHAVE:** *Alchornea glandulosa*; fungos endofíticos; produtos naturais; macrófagos; óxido nítrico; citocinas pró-inflamatórias; células tumorais de câncer de mama (LM2), células tumorais de câncer de pulmão (LP07), células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), atividade antiinflamatória; atividade antitumoral; atividade antiangiogênica.

ABSTRACT

Natural products have contributed enormously to the development of important therapeutic drugs used currently in modern medicine. Plants produce a vast number of compounds that, either directly or after chemical modifications, exert pharmacological activities. Endophytic fungi, organisms which live in plants, are also being recognized as new sources of biological active substances. Nowadays, the relationship among inflammation, innate immunity and cancer are widely accepted. Inflammatory mediators as nitric oxide (NO) and cytokines produced by activated macrophages are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases. Besides that, angiogenesis inhibition has been accepted as a promising therapy for the control of tumor growth, metastasis and also chronic inflammatory conditions. *Alchornea glandulosa* Poepp & Endl. (Euphorbiaceae) is a plant that demonstrates anti-inflammatory activity. It can be found in Brazil, distributed from southeast to south, mainly in the Atlantic Forest and Cerrado. The anti-inflammatory, antitumor and antiangiogenic potential of the compounds obtained from this plant (ethyl acetate fraction and the pure compounds isoquercitrin, afzelin, gallic acid, pterogynine and pterogynidine) and from the endophytic fungi present in its leaves (ALG-A, ALG-02 and ALG-03 ethyl acetate extracts) were studied using macrophage cultures, tumor cell lines (LM2 and LP07) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). To evaluate anti-inflammatory and antitumor activity, *in vitro* assays were utilized to determine NO (Griess reagent), TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-12 proinflammatory cytokines (ELISA) and cytotoxicity (MTT). Tumor growth inhibition rate was also studied *in vivo*. Apoptosis (TUNEL assay), proliferation (bromodeoxyuridine – BrdU), invasion (double-chamber assay), capillary-like structures formation (matrigel) and NF κ B activity (ELISA) were realized to study the features of the angiogenic process. The results showed that all compounds tested exhibited anti-inflammatory activity, inhibiting significantly NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-12 production in a dose dependent manner. The extract ALG-02 presented the highest anti-inflammatory potential in this work, inhibiting the production of NO (100%), TNF- α (98,71%), IL-1 β (89,39%), IL-6 (99,74%) and IL-12 (86,79%). Gallic acid (IC₅₀=5,48 μ g/mL), the extract ALG-03 (IC₅₀=9,37 μ g/mL) and pterogynidine (IC₅₀=18,66 μ g/mL) showed a strong cytotoxic activity against LM2 tumoral cells. Afzelin (IC₅₀=2,31 μ g/mL), gallic acid (IC₅₀= 3,35 μ g/mL), the extract ALG-02 (IC₅₀=7,87 μ g/mL) and *A. glandulosa* ethyl acetate fraction (IC₅₀=10,15 μ g/mL), demonstrated a powerful cytotoxicity against LP07 cells. *In vivo*, the ethyl acetate fraction and ALG-02 extract strongly inhibited both LM2 and LP07 tumoral growth and the extract ALG-03 also strongly inhibited LP07 tumoral growth. In the angiogenesis assays, *A. glandulosa* ethyl acetate fraction, ALG-02 extract, afzelin and pterogynidine significantly decrease HUVEC proliferation. It is important to notice that pterogynidine induce an 8-fold decrease in the percentage of endothelial cells proliferation. Besides that, ethyl acetate fraction and pterogynidine provoked a 19-fold and a 14-fold increase in HUVEC apoptotic rate, respectively. Also, a decrease in invasion capacity in the HUVEC cultures treated with *A. glandulosa* ethyl acetate fraction, ALG-02 extract, afzelin and pterogynidine have been found. The ethyl acetate fraction and pterogynidine caused an effective decline in invasion capacity 7 and 24 times higher than control. Moreover, ethyl acetate fraction, ALG-02 extract, afzelin and pterogynidine also led to a reduction in the number of capillary-like structures formation when HUVEC were cultured on growth factor reduced-Matrigel-coated plates. Ethyl acetate fraction, ALG-02 extract and pterogynidine drastically prevented the formation of these structures indicating that they can strongly disrupt tube formation. Finally, it was investigated the possible mechanism by which ethyl acetate fraction and pterogynidine exerted high antiangiogenic activity. Thus, it was verified

that these two compounds could inhibit the transcription factor NF κ B in endothelial cells. Our findings led us to propose that tested compounds can inhibit tumor growth through the suppression of blood vessel development, being potential antitumor agents. These results also show that these agents are useful in angiogenesis dependent diseases, especially tumor treatment or prevention. Consequently, all compounds studied in this research, obtained from both plant and fungi, presented several biological activities, among them, anti-inflammatory, antitumor and antiangiogenic activities. *A. glandulosa* ethyl acetate fraction, ALG-02 extract, afzelin and pterogynidine demonstrated simultaneously these three biological activities and they can be considered novel compounds potentially beneficial as antitumor drugs pointed to inflammatory and angiogenic process. Accordingly, this research provided a better comprehension of *A. glandulosa* pharmacological actions, showing the importance of Brazilian biodiversity and also contributing to the understanding of endophytic fungi and medicinal plants relationship.

□ **KEYWORDS:** *Alchornea glandulosa*; endophytic fungi; natural product; macrophages; nitric oxide; proinflammatory cytokines; mammary tumor cell line (LM2), lung tumor cell line (LP07), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), anti-inflammatory activity; antitumor activity; antiangiogenic activity.

I - INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. É extraordinário ressaltar também que o Brasil possui cerca de 120 mil espécies vegetais sobre um total mundial de, aproximadamente, 350 mil espécies. Destaca-se ainda que folhas de árvores tropicais representam fontes de grande diversidade de fungos, contendo numerosas espécies ainda não encontradas em outros biomas. Esse imenso patrimônio tem na atualidade uma importância econômica e estratégica inestimável, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos que reside sua maior potencialidade (ARNOLD; LUTZONI, 2007; CALIXTO, 2003; YUNES; CALIXTO, 2001).

O gigantesco valor dos produtos naturais no desenvolvimento de novos fármacos é evidente quando se analisa que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003).

Um argumento a favor da conservação da biodiversidade ambiental é que as espécies de organismos ainda não descobertas poderiam proporcionar produtos de grande importância para os seres humanos. Muitos endófitos, organismos que vivem no interior das plantas sem causar danos a seu hospedeiro, produzem compostos biologicamente ativos que inibem o crescimento de outros microrganismos. Em alguns casos, esses endófitos adquirem a habilidade de sintetizar os mesmos produtos naturais produzidos pelas plantas com funções de defesa. Conseqüentemente, esses microrganismos são fontes de novos produtos para uso na medicina (SMITH et al., 2008; WILSON, 1995).

A inflamação excessiva é considerada um fator crítico em muitas doenças humanas, incluindo o câncer, a obesidade, o diabetes tipo II, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e até mesmo no envelhecimento

(SANTANGELO et al., 2007). É importante observar que a modulação da secreção de NO e citocinas pró-inflamatórias pode oferecer abordagens modernas no tratamento dessas doenças (BATRA et al., 2007; ESPOSITO; CUZZOCREA, 2007; SPELMAN et al., 2006; VAFEIADOU et al., 2007).

Acredita-se que o desenvolvimento do câncer a partir de processos inflamatórios possa ser orientado pelas células inflamatórias e por uma variedade de mediadores, incluindo citocinas e enzimas que juntas estabelecem um microambiente inflamatório (LU et al., 2006).

Aproximadamente 15-20% de todos os tipos de câncer são iniciados ou exacerbados pela inflamação. O recrutamento e a infiltração dos macrófagos no microambiente tumoral auxiliam a progressão maligna das células tumorais. O início e a progressão do câncer estão também relacionados à angiogênese. A angiogênese tumoral ou a formação de novos vasos em tumores possui um importante papel no desenvolvimento de carcinomas em vários tecidos. Células tumorais necessitam de vasos sanguíneos para crescer e se estender aos tecidos adjacentes. Dessa forma, a supressão da angiogênese tumoral tem se tornado um foco central da terapia do câncer (WANG et al., 2005).

Tanto a inflamação quanto a angiogênese são exacerbadas pela produção aumentada de citocinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos e prostaglandinas. A infiltração de macrófagos é uma característica comum da inflamação, da angiogênese e do câncer e tem sido recentemente pesquisada na tentativa de desenvolvimento de novas estratégias de tratamento do câncer (ONO, 2008).

Estudos biológicos foram realizados anteriormente com a planta *Alchornea glandulosa*, conhecida popularmente como tapiá. A capacidade imunomodulatória da fração extraída com acetato de etila da *A. glandulosa* foi avaliada utilizando-se culturas

de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) pelos macrófagos estimulados por acetato de forbol miristato (PMA) ou lipopolissacarídeo (LPS), respectivamente, foi fortemente inibida pela fração da planta. A produção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) por macrófagos ativados por LPS, também pôde ser parcialmente inibida. Portanto, a fração acetato de etila obtida de *A. glandulosa* apresentou atividade antiinflamatória, confirmando dessa maneira seu uso popular (LOPES, 2004; LOPES, 2005).

Dessa forma, os resultados anteriores estimularam a continuidade das pesquisas com a *Alchornea glandulosa*. Este trabalho se concentrou na avaliação das atividades antiinflamatória, antitumoral e antiangiogênica. Através de experimentos utilizando-se culturas de macrófagos murinos, linhagens tumorais murinas de câncer de mama (LM2) e pulmão (LP07) e culturas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) foram estudados os compostos obtidos a partir das folhas da planta (fração acetato de etila e os compostos puros isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) e de fungos endofíticos presentes nessa mesma planta (extratos acetato de etila ALG- A, ALG-02 E ALG-03).

Uma vez que a inflamação crônica promove e potencializa o desenvolvimento, o crescimento e a progressão tumoral, é possível prever que um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais agem os produtos naturais, promova o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos antitumorais direcionados ao processo inflamatório.

II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Plantas medicinais – passado, presente e futuro

A partir de uma perspectiva histórica, a produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de doenças começaram com o uso de plantas medicinais (SCHULZ et al., 2002). O termo plantas medicinais refere-se única e exclusivamente às espécies vegetais que, durante séculos, foram sendo incorporadas à cultura de todos os povos graças a suas potencialidades terapêuticas. Após estudos criteriosos, representam uma fonte inesgotável de medicamentos aprovados e comumente utilizados, bem como uma rica fonte de novas substâncias com atividade biológica potencial (DI STASI, 1995).

As plantas têm sido, desde a antiguidade, um recurso ao alcance do ser humano. Durante milênios, o homem empiricamente aprofundou seus conhecimentos a fim de melhorar suas condições de alimentação e curar enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução. A partir do século XIX, a humanidade se depara perplexa diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico presente nas plantas medicinais. Foi descoberto que substâncias ativas, em estado natural ou após sofrerem transformação química, possuem atividades farmacológicas, sendo que, muitas vezes, essas atividades são confirmadas pelo uso popular e comprovadas cientificamente (MIGUEL; MIGUEL, 2000).

Somente por volta de 1970, com o reconhecimento dos benefícios da medicina chinesa pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e também com o surgimento de alguns importantes medicamentos obtidos de fontes naturais, houve um interesse renovado na pesquisa de produtos naturais (YUNES; CALIXTO, 2001). Hoje, a procura de compostos úteis a partir de plantas medicinais é o objetivo de companhias farmacêuticas e instituições de pesquisa (KONG et al., 2003).

O Brasil possui cerca de 22% das plantas superiores existentes no planeta (ELIZABETSKY; COSTA-CAMPOS, 1996). Sabe-se que diversidade biológica implica em diversidade química. Constantes inovações químicas existem em ecossistemas onde a corrida evolucionária para a sobrevivência é mais ativa. As florestas tropicais são notáveis exemplos desse tipo de ambiente. A competição é alta, os recursos são limitados e a pressão seletiva atinge o seu máximo, aumentando a probabilidade desse espaço ser fonte de novas estruturas moleculares e compostos biologicamente ativos (STROBEL; DAISY, 2003).

No Brasil, cerca de 20% da nossa população consome 63% dos medicamentos disponíveis e o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico (DI STASI, 1995). Essa não é uma situação que ocorre apenas no nosso país, uma vez que aproximadamente 70 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem parcial ou totalmente de medicamentos à base de plantas (WIJESEKERA, 1991).

Um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de produtos naturais. Somente no período entre 1983-1994, dos 520 novos fármacos aprovados pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (“Food and Drug Administration” - FDA), 220 (39%) foram obtidos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

A importância do estudo das plantas medicinais determina um enorme impulso no progresso e independência sócio-econômica e científica do Brasil (MIGUEL; MIGUEL, 2000). Não podemos esquecer ainda que das 350 mil espécies de plantas que existem catalogadas em todo o mundo, cerca de 60 mil estão aqui no Brasil. Certamente, devido a esse fato, este país é um alvo de interesse internacional para o próximo século (CALIXTO, 1996).

Relatos revelam ainda que cerca de 80% da população mundial utiliza plantas para fins medicinais (FETROW; AVILA, 2000). Contudo, a maioria das espécies de plantas não foi investigada tanto química quanto biologicamente com grandes detalhes, apesar de todas as poderosas técnicas analíticas disponíveis. Mesmo as plantas bem analisadas requerem estudos clínicos adicionais (PHILLIPSON, 2003).

Um vasto número de substâncias naturais é produzido pelas plantas na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Essas substâncias podem ser isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas, minerais, além de muitas outras (WILLIAMS, 2001). Além disso, estudos científicos anteriores estabeleceram que plantas e compostos puros obtidos delas possuem propriedades antiinflamatórias, antitumorais e antiangiogênicas (AGARWAL; SINGH, 1999; CRAGG et al., 1994; GANJU et al., 2003; KARKABOUNAS et al., 2000; MAHESHWARI et al., 2006; MOHAN et al., 2004; OPOKU et al., 2000; SANDOVAL et al., 2000; SEO et al., 2001). Assim, já é de conhecimento dos pesquisadores que algumas plantas possuem atividades biológicas bem estudadas e definidas, contudo essa área ainda precisa ser melhor avaliada e explorada.

Portanto, a história das plantas medicinais não está caminhando para o seu fim, pelo contrário, está renascendo devido ao sucesso do desenvolvimento de novos compostos e ao interesse da população por todos os tipos de produtos naturais, ecologicamente sustentáveis e biodegradáveis (WILLIAMSON et al, 1996). De acordo com as perspectivas da modernidade, a saúde do futuro estará voltada para a medicina preventiva, onde a ciência buscará na natureza meios profiláticos que auxiliem o homem na defesa de seus males (MIGUEL; MIGUEL, 2000). As plantas medicinais são o alicerce e o futuro da medicina humana (SUMNER, 2000).

2.2. A planta *Alchornea glandulosa*

O gênero *Alchornea* pertence à família Euphorbiaceae e contém cerca de 50 espécies, cuja distribuição geográfica abrange a região tropical da América, África e Ásia (CARVALHO, 1994). Dentre essas espécies, cerca de dez ocorrem na América Central e América do Sul. *Alchornea glandulosa* Poepp & Endl. (Euphorbiaceae) (Figura 1) é uma espécie dióica, com cerca de 10 a 20 metros de altura, e que no Brasil está distribuída do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul. É perenifólia, heliófila, pioneira, freqüente em beiras de rios e em planícies aluviais da Floresta Pluvial Atlântica. Possui folhas simples, recurvadas nos bordos com 8 a 16 centímetros de comprimento. Os frutos amadurecem de setembro a outubro e de dezembro a janeiro (LORENZI, 1992). Essa espécie também é conhecida como tapiá, tanheiro-de-folha-longa, maria-mole, tamanqueiro (LISTA DE ÁRVORES NATIVAS DO BRASIL, 2004).

Trabalhos publicados relatam que a planta *A. glandulosa* contém compostos com diversas propriedades biológicas.

O fracionamento do extrato metanólico obtido das folhas de *A. glandulosa* por Conegero et al. (2003) resultou no isolamento de uma mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol, da loliolida, do alcalóide guanidínico *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenilguanidina e da corilagina. Os autores citam que embora a loliolida já tenha sido isolada de outras plantas e organismos marinhos, esse trabalho representa o primeiro relato da ocorrência dessa substância no gênero *Alchornea* e na família Euphorbiaceae. Várias propriedades biológicas reportadas para essa substância são mencionadas pelos autores, incluindo atividades como repelente, inibidora de germinação, imunossupressora e citotóxica contra carcinoma humano de nasofaringe (KB) e leucemia linfóide (P388). O alcalóide guanidínico isolado foi submetido a um

bioensaio com cepas modificadas de *Saccharomyces cerevisiae*, onde ficou demonstrado que alcalóides que contêm unidades isopentenílicas, como no caso do alcalóide *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenilguanidina, são potenciais agentes antitumorais.

Os efeitos do extrato metanólico das folhas de *A. glandulosa* em lesões gástricas induzidas por vários agentes foram estudados. O pré-tratamento de ratos com o extrato inibiu significativamente e de maneira dose-dependente as lesões gástricas causadas por etanol absoluto, ácido clorídrico/etanol e fármacos antiinflamatórios não esteroidais. Houve também indução da ação anti-secretória através de vias locais e sistêmicas, diminuindo expressivamente o conteúdo ácido gástrico. Uma única administração oral do extrato estimulou fortemente a proliferação celular do epitélio gástrico, contribuindo para a rápida cura das úlceras gástricas induzidas por ácido acético. Além disso, não foi observada toxicidade durante o tratamento com o extrato. A avaliação fitoquímica do extrato levou ao isolamento de miricetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, quercetina, amentoflavona, galato de metila, ácido gálico e pteroginidina. Os autores acreditam que esses compostos podem contribuir para os efeitos antiulcerogênicos observados (CALVO et al., 2007).

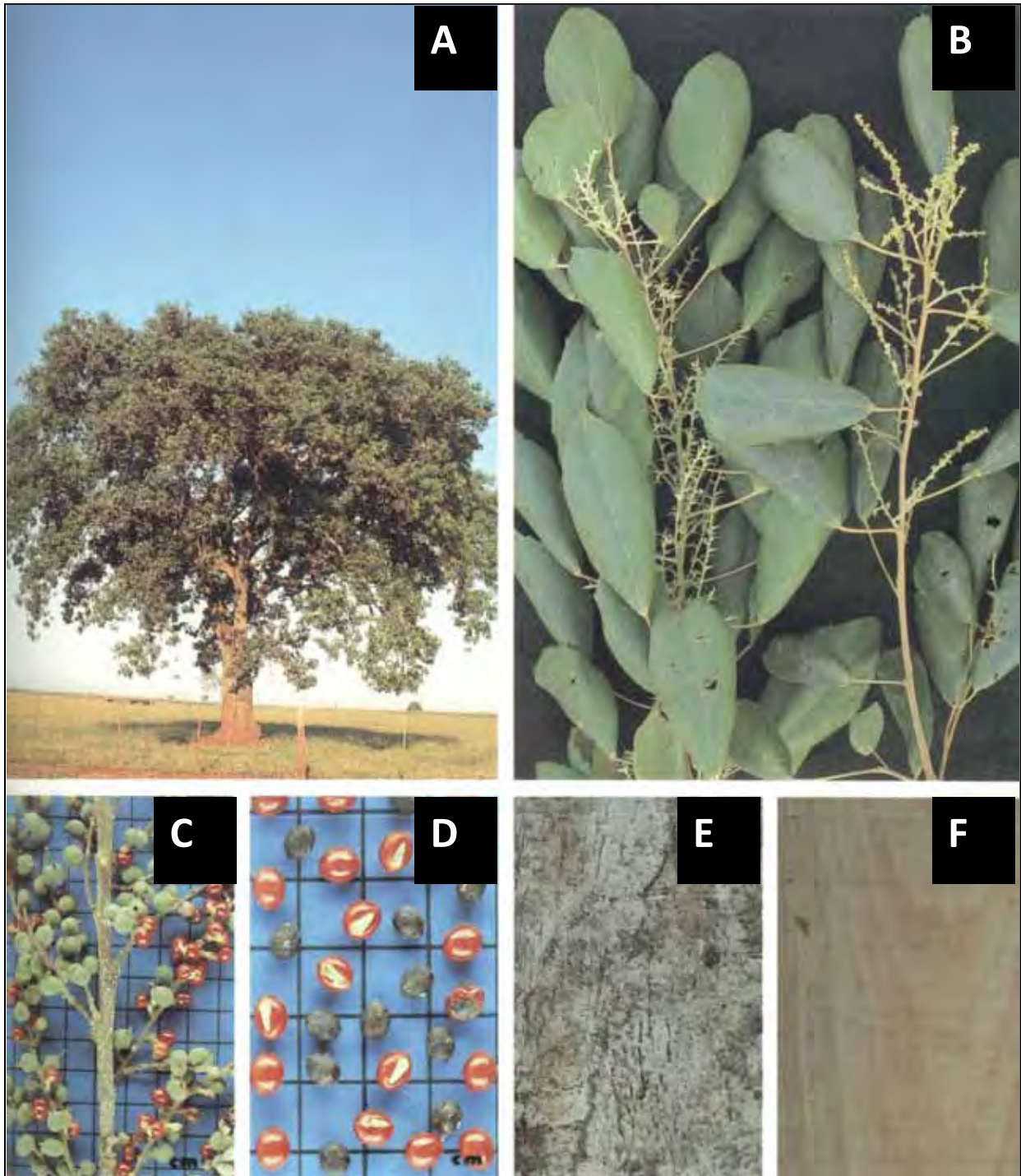


Figura 1. *Alchornea glandulosa*. (A) árvore, (B) folhas, (C) frutos, (D) sementes, (E) casca e (F) madeira (Lorenzi, 1992).

2.3. Fungos endofíticos

Nas últimas décadas, os cientistas começaram a perceber que as plantas servem de reservatório para um número incontável de microrganismos chamados endófitos. Por definição, esses microrganismos, na maioria fungos e bactérias, vivem nos espaços intercelulares dos tecidos vegetais. Alguns desses endófitos podem produzir substâncias bioativas que podem estar envolvidas na relação hospedeiro-endófito (STROBEL, 2003).

Existem mais de 300.000 espécies de plantas no planeta e cada planta pode abrigar um ou mais microrganismos endofíticos. Além disso, áreas com alta incidência de plantas também possuem endófitos específicos que podem ter evoluído juntamente com essas espécies (STROBEL; DAISY, 2003).

Em 1999, Fröhlich e Hyde sugeriram que uma taxa de 33 espécies de fungos (entre endofíticos e saprofíticos) por espécie de planta superior seria apropriada para as plantas tropicais. Essa conclusão foi reforçada através de outros estudos que mostram a riqueza de endófitos presentes em folhas de plantas tropicais. Lodge et al. (1996) encontraram 17 espécies de microrganismos endofíticos em uma única folha de *Manilkara bidentata* em Porto Rico. Além disso, estudos indicaram que a incidência e a diversidade de endófitos nas regiões tropicais são muito maiores do que em outras regiões do mundo (ARNOLD; LUTZONI, 2007).

Apesar do termo “endófito” ser empregado para todos os organismos que habitam o interior das plantas, micologistas utilizam o termo “fungo endofítico” para aqueles fungos que habitam as plantas sem causar sintomas visíveis de doença. O termo se refere apenas aos fungos que vivem sistematicamente no interior de plantas habitando, de modo geral, suas partes aéreas como folhas e caules, podendo também

estar presentes nas raízes. A colonização fúngica pode ser do tipo intercelular ou intracelular, localizada ou sistêmica (ANDREWS, 1991; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Diversas associações com as plantas hospedeiras foram relatadas, desde relações mutualísticas e comensais até a existência de patógenos latentes (RAKOTONIRIANA et al., 2008). Com a evolução das espécies, os fungo endofíticos se especializaram em invadir espaços celulares dos tecidos vegetais através das raízes do hospedeiro, aberturas naturais como estômatos e feridas causadas por choques mecânicos, insetos e fungos patogênicos. Uma vez instalado, o endófito pode habitar a planta por toda sua vida, sendo transmitido, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (MELO; AZEVEDO, 1988).

Além de proteger as plantas contra insetos-pragas e patógenos, os fungos endofíticos ainda são capazes de produzir metabólitos que aumentam o crescimento e enraizamento da planta hospedeira e a sua resistência a estresses bióticos e abióticos (HALLMANN et al., 1997).

Taxol, substância utilizada no tratamento do câncer de mama, de ovário e pulmão, foi inicialmente isolada da planta *Taxus brevifolia* (OBERLIES; KROLL, 2004). Entretanto, o isolamento de taxol do meio de cultura produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreane* (STIERLE et al., 1993), isolado da mesma planta, encoraja o estudo de fungos associados com espécies vegetais, objetivando a verificação da co-produção de substâncias produzidas pela planta.

Toda vez que são encontradas novas áreas de diversidade biológica, novos produtos naturais são encontrados. Desse modo, o que geralmente é mais interessante na pesquisa de produtos naturais origina-se principalmente de organismos recentemente descobertos. A compreensão de que existe um enorme e inexplorado grupo de fungos vivendo no interior das plantas superiores incentivou os laboratórios a procurarem por

novos compostos biologicamente ativos obtidos desses fungos endofíticos (CLARDY; WALSH, 2004).

2.4. Imunidade inata, inflamação e câncer

O sistema imunológico desempenha atividades complexas de defesa do organismo. A pesquisa básica das substâncias naturais com propriedades imunomodulatórias pode ser feita através de ensaios de estimulação da imunidade inespecífica, como por exemplo através da avaliação dos granulócitos, macrófagos, sistema complemento, células “natural killer” (NK) e seus efeitos sobre a fagocitose, proliferação linfocitária, migração de linfócitos T, ativação de macrófagos, etc. Outras pesquisas mais recentes na área de substâncias imunomodulatórias incluem a investigação da produção de citocinas por macrófagos estimulados com produtos de plantas (WILLIAMS, 2001).

Os macrófagos possuem um papel central no sistema imunológico, defendendo o hospedeiro contra microrganismos (ZWILLING; EISENSTEIN, 1994). Essas células não funcionam apenas como fagócitos, uma vez ativadas, elas participam em todas as fases da resposta imune. São importantes como células inflamatórias, tumoricidas e microbicidas, sendo capazes de secretar mais de cem produtos biologicamente ativos como enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação, espécies reativas de nitrogênio como o NO e citocinas (PARSLOW et al., 2000; ROITT et al., 1999).

O NO é uma molécula que atua em muitos processos fisiológicos, entre eles na regulação do sistema imune. Essa molécula é formada através da oxidação do átomo de nitrogênio do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e, logo em seguida, se transforma em nitrito (NO_2^-) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; KIECHLE; MALINSKI, 1993).

Ultimamente, já está bem definido que o NO tem um duplo papel no processo inflamatório. O NO secretado em altos níveis por macrófagos ativados é importante na defesa contra microrganismos e células tumorais (MacMICKING et al., 1997). Entretanto, os efeitos pró-inflamatórios do NO parecem ser mediados pela sua produção exagerada e estão relacionados a várias doenças como o choque séptico, doenças auto-imunes e cardiovasculares (DINERMAN et al., 1993; IALENTI et al., 1993; KILBOUM; GRIFFITH, 1992; MONCADA et al., 1991). Compostos obtidos de plantas que interferem com a síntese de NO podem ser candidatos importantes para o desenvolvimento de fármacos antiinflamatórios (YUNES; CALIXTO, 2001).

As citocinas são mediadores solúveis liberados por linfócitos e células do sistema fagocitário, essenciais na comunicação intercelular e em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Elas também modulam a inflamação e a imunidade, regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e também de células não leucocitárias (OPPENHEIM et al., 1994). Além disso, possuem um importante papel na patogênese de uma variedade de doenças inflamatórias e auto-imunes (DINARELLO et al., 1993; FELDMANN et al., 1996; GIBSON, 2004; SCHACHNA, 2004).

O TNF- α é uma citocina que possui importantes efeitos biológicos em uma variedade de células. Esses efeitos estão na maioria das vezes relacionados a processos imunomodulatórios e inflamatórios (CASALE et al., 1996). Essa citocina atua na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções. Tem ainda a capacidade de causar o choque séptico, estimular linfócitos T e B, suprimir a lipase lipoprotéica, induzir a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e várias quimiocinas, levando ao choque séptico. Além disso, o TNF- α causa também numerosas mudanças pró-inflamatórias nas células endoteliais (CE), incluindo a produção de outras citocinas, a expressão de

moléculas de adesão e a liberação de substâncias pró-coagulantes (EIGLER et al., 1997; PALLADINO et al., 2003).

Grandes quantidades de NO e TNF- α geradas por macrófagos ativados induzem diversas condições fisiopatológicas durante a inflamação aguda e crônica (MANJEET; GHOSH, 1999). Dados recentes expandiram o conceito de que a inflamação é um componente crítico na progressão de tumores. Diversos tipos de câncer originam-se de sítios de infecção, irritação crônica ou inflamação, tornando-se claro que o microambiente tumoral, que é orquestrado pelas células inflamatórias, é um participante indispensável no processo neoplásico. Além disso, durante o dano tecidual, a proliferação celular é potencializada enquanto o tecido se regenera. Proliferação e inflamação diminuem após a remoção do agente agressor ou quando o reparo do tecido é finalizado. Ao contrário, células com dano no ácido desoxiribonucléico (DNA) continuam a proliferar em ambiente rico em células antiinflamatórias e fatores de crescimento. Atualmente, a relação causal entre inflamação, imunidade inata e câncer é largamente aceita, contudo muitos dos mecanismos moleculares e celulares que medeiam esta relação permanecem não esclarecidos (COUSSENS; WERB, 2002).

A reação inflamatória resulta da produção local de inúmeros mediadores a partir de fontes humorais ou celulares. Estes mediadores são os responsáveis pela uniformidade quase estereotipada da reação inflamatória, independente da natureza do agente agressor. A IL-1 e o TNF- α são derivados principalmente das células mononucleares e macrófagos e induzem a expressão de vários genes que estimulam a síntese de inúmeras proteínas que contribuem para os fenômenos inflamatórios. Estes dois fatores são considerados os mediadores principais das respostas biológicas ao LPS bacteriano e muitos outros estímulos infecciosos. Esses dois mediadores produzem muitas respostas pró-inflamatórias como a indução da febre, sono, anorexia,

mobilização e ativação dos leucócitos polimorfonucleares, indução das enzimas ciclooxigenases, aumento da expressão das moléculas de adesão, ativação dos linfócitos B, T e células NK e estimulação da produção de outras citocinas. Além disso, outras ações desses fatores provavelmente contribuem para a fibrose e degeneração tecidual da fase proliferativa crônica da inflamação, estimulação da proliferação de fibroblastos, indução da colagenase e ativação dos osteoblastos e osteoclastos. A IL-1 e o TNF- α ainda acentuam a expressão de muitos tipos de genes, em parte talvez pela ativação de fatores de transcrição como fator nuclear kB (NF κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1) (CARVALHO, 2004).

Citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), têm uma função central na coordenação da resposta corporal à inflamação (PALLADINO, 2003; PAPANICOLAOU et al., 1998). Como o macrófago é considerado uma fonte de IL-6, a estimulação com LPS provoca a liberação dessa citocina (MULLER et al., 1998). IL-6 e TNF- α , junto com a IL-1, sinergisticamente controlam infecções através da regulação da produção de proteínas de fase aguda e do aumento da temperatura corporal (SUFFREDINI et al., 1999).

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno em resposta à estimulação por uma série de microrganismos e seus produtos. Possui atividades biológicas múltiplas, principalmente sobre linfócitos T e células NK, induzindo a produção de interferon- γ (IFN- γ). Evidências sugerem um papel importante da IL-12 em modelos roedores de patogênese de doenças autoimunes mediadas por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), como esclerose múltipla, artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais e na forma aguda da doença do enxerto versus hospedeiro (TRINCHIERI; SCOTT, 1999). Durante a inflamação ou resposta imune, a capacidade da IL-12 em modular a expressão de

receptores de citocinas nos linfócitos provavelmente afeta a sensibilidade dessas células à cascata de citocinas (TRINCHIERI, 1994).

Para a real compreensão do papel da inflamação na evolução do câncer, é necessário entender o que é a inflamação e como ela contribui nos processos fisiológicos e patológicos, como no reparo tecidual e nas infecções (Figura 2). Em resposta ao dano tecidual, uma rede de sinais químicos é iniciada na tentativa de reparar o tecido. Esse processo envolve a ativação e migração de neutrófilos, monócitos, mastócitos e eosinófilos para a área afetada. Monócitos, que se diferenciam em macrófagos nos tecidos, migram para o local da lesão guiados por fatores quimiotáticos. Uma vez ativados, os macrófagos são as principais fontes de fatores de crescimento e citocinas, que afetam profundamente as CE, epiteliais e mesenquimais presentes no microambiente local. O perfil de citocinas presentes no sítio inflamatório é muito importante no desenvolvimento de doenças crônicas. A citocina pró-inflamatória TNF- α controla as populações de células inflamatórias e também participa de vários outros aspectos do processo inflamatório. O conceito padrão é de que a inflamação normal, como aquela associada ao reparo tecidual, é geralmente autolimitada. Contudo, a falta de regulação de um dos fatores participantes do processo leva a anormalidades e doenças, como ocorre durante a progressão neoplásica (COUSSENS; WERB, 2002).

Uma vez que a inflamação contribui com o desenvolvimento de pelo menos 15% de todos os cânceres, medicamentos antiinflamatórios não esteroidais, geralmente utilizados para inibir a dor, febre e inflamação, podem ser úteis. Esses fármacos possuem uma utilização emergente como quimioterápicos na prevenção e tratamento de cânceres humanos e estão associados com riscos reduzidos de câncer de mama, pulmão e cólon (DUPERRON; CASTONGUAY, 1997; MARNETT, 1992; MARX, 2004; SHARPE et al., 2000).

O número de mortes por câncer no mundo está projetado para crescer 45% de 2007 até 2030 (de 7,9 milhões para 11,5 milhões de mortes), influenciado em parte pelo aumento da população mundial e também pelo envelhecimento populacional. Os cálculos levam em consideração um pequeno decréscimo nas taxas de mortalidade para alguns tipos de câncer que ocorrem em países ricos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

A cada ano, mais de 11 milhões de novos casos de câncer são diagnosticados e mais de 7 milhões de pessoas morrem da doença, sendo que mais de 70% das mortes ocorrem em países em desenvolvimento. Em 2020, se as atuais tendências continuarem, o número de casos de câncer vai aumentar para 16 milhões por ano e mais de 10 milhões de pessoas irão morrer da doença (“INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER”, 2008).

O câncer de pulmão mata mais pessoas no mundo do que qualquer outro tipo de câncer, uma tendência que deve continuar até 2030 a menos que esforços globais para o controle do tabaco sejam altamente intensificados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Além disso, o número estimado de casos de câncer de mama se elevou de 10.000 em 1948 para mais de 40.000 em 2008 (MEDICAL NEWS TODAY, 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008).

Uma característica atrativa das plantas é o seu possível uso na prevenção do câncer. Plantas têm sido usadas há muito tempo e, ainda assim, poucos relatos de efeitos adversos em seus usuários são conhecidos. Se um antiinflamatório não-esteroidal natural é seguro para o uso comum, futuros protocolos de prevenção do câncer podem envolver a combinação desses antiinflamatórios naturais com os quimicamente desenvolvidos, permitindo o uso de doses reduzidas dos medicamentos químicos (WARGOVICH et al., 2001). Uma vez que a inflamação está relacionada à promoção tumoral, espera-se que substâncias antiinflamatórias exerçam efeitos quimiopreventivos sobre a carcinogênese (SURH et al., 2001).

Vários mecanismos de prevenção do câncer utilizando fitoquímicos têm sido estudados, incluindo a modulação da sinalização celular, a inibição da inflamação, ações anti-hormonais, modulação de fatores de crescimento, potencialização da detoxificação e eliminação, atividade antioxidante, influência no ciclo e diferenciação celular, indução da apoptose, supressão da proliferação e angiogênese (MESKIN et al., 2004, TSUDA et al., 2004).

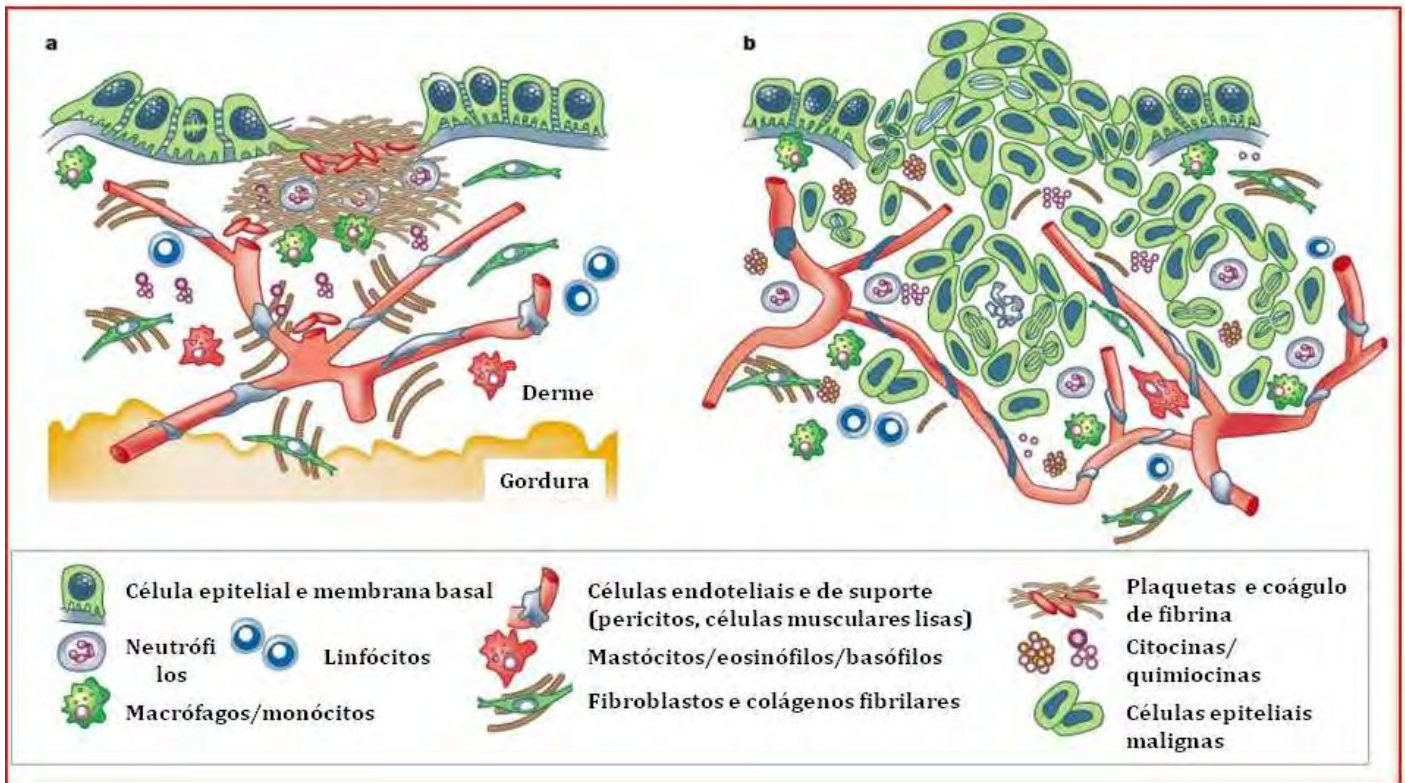


Figura 2. Reparo tecidual versus crescimento tumoral invasivo. (a) Tecidos normais têm um arquitetura altamente organizada. Células epiteliais ficam localizadas acima da membrana basal e separadas do estroma vascular (derme). Plaquetas são ativadas e formam tampão homeostático, durante um ferimento ou dano tecidual, liberando mediadores vasoativos que regulam a permeabilidade vascular, o influxo de fibrinogênio e a formação do coágulo de fibrina. Fatores quimiotáticos como o fator de crescimento transformante- β e fator de crescimento derivado de plaquetas, iniciam a granulação tecidual, a ativação de fibroblastos e de enzimas proteolíticas necessárias para a remodelação da matriz extracelular (como por exemplo, matriz metaloproteinasas ou ativador do plasminogênio de tipo uroquinase). Em combinação, granulócitos, monócitos e fibroblastos são recrutados. A rede vascular é restaurada e a reepitalização da ferida ocorre. Células epiteliais e estromais se comunicam através de sinais facilitando o reparo tecidual. (b) Os carcinomas invasivos são menos organizados. A angiogênese associada a neoplasias e a linfangiogênese produzem uma organização caótica de vasos sanguíneos e linfáticos onde as células neoplásicas interagem com outros tipos celulares (mesenquimais, hematopoiéticos e linfóides) e com a matriz extracelular remodelada. Apesar da rede vascular não se comportar do mesmo modo durante a progressão neoplásica e o reparo tecidual, muitas interações recíprocas ocorrem. Células neoplásicas produzem citocinas e quimiocinas mitogênicas e quimioatraentes para granulócitos, mastócitos, monócitos/macrófagos, fibroblastos e CE. Além disso, fibroblastos ativados e as células inflamatórias infiltrantes secretam enzimas proteolíticas, citocinas e quimiocinas, mitogênicas para células neoplásicas e também para as CE envolvidas na neoangiogênese e na linfangiogênese. Esses fatores potencializam o crescimento tumoral, estimulam a angiogênese, induzem a migração e maturação de fibroblastos e possibilitam a metástase através da rede venosa e linfática (Fonte: COUSSENS; WERB, 2002).

2.5. Angiogênese

Em 1971, Folkman propôs que o crescimento tumoral e a metástase eram dependentes da angiogênese e por esta razão, bloquear a angiogênese poderia ser uma estratégia para impedir o crescimento tumoral (Figura 3) (CARMELIET; JAIN, 2000).

Uma vez que a angiogênese é essencial para o desenvolvimento tumoral, muitos pesquisadores estão à procura de agentes antiangiogênicos que possam ser úteis no tratamento do câncer ou possam ser utilizados como um suplemento nos tratamentos quimioterápicos padronizados (EL SAYED, 2005; GATELY; LI, 2004; PRAT et al., 2007).

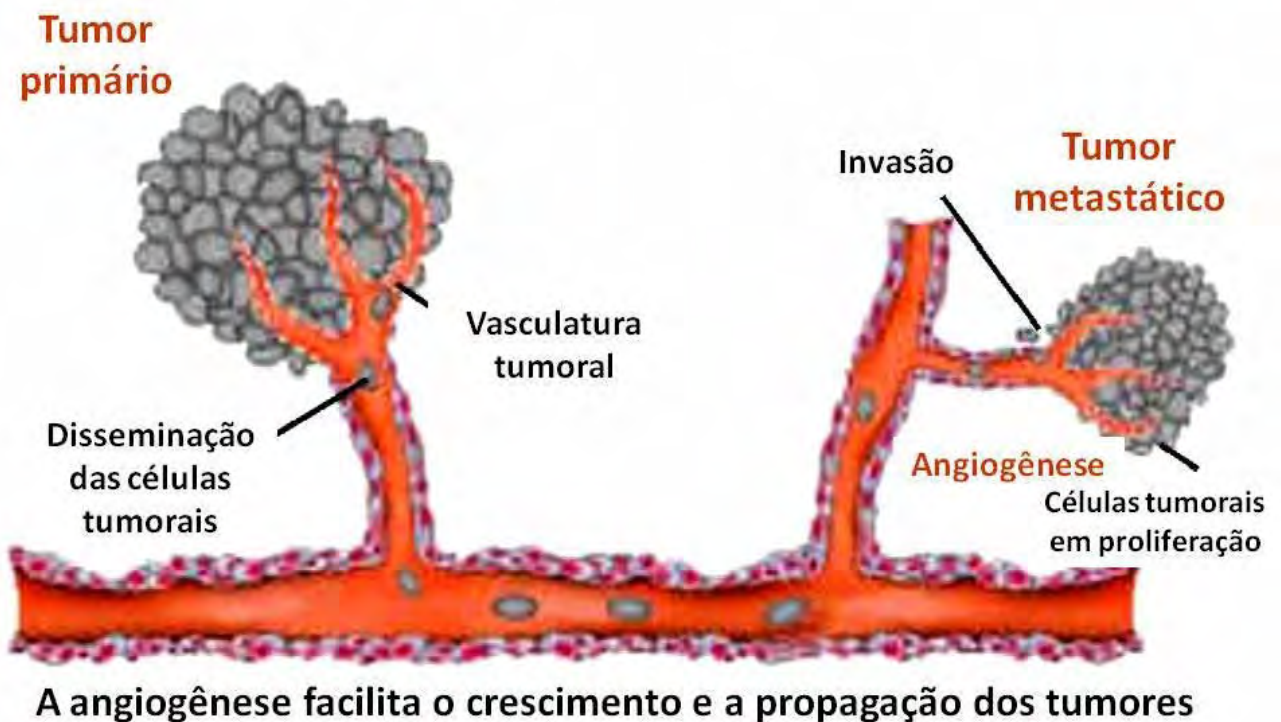


Figura 3. Angiogênese e a propagação de tumores (Fonte: PANDYA et al., 2006).

Experimentos diversos e observações clínicas suportam a existência de uma ligação bioquímica e molecular entre vasodilatação, produção de NO e angiogênese. Desse modo, a via do NO parece ser um alvo promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas pró e antiangiogênicas. Inibidores desse mediador parecem ser apropriados na redução de edemas, bloqueio da angiogênese e também facilitando a distribuição de medicamentos antitumorais (MORBIDELLI et al., 2003).

A angiogênese, desenvolvimento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, requer a ativação coordenada das CE que migram e proliferam em resposta a fatores de crescimento até a formação de vasos funcionais (MORBIDELLI et al., 2003). O processo angiogênico tem um papel fundamental em vários eventos fisiológicos e patológicos do organismo e envolve vários tipos celulares e mediadores que se interagem e acabam por estabelecer um microambiente específico. Células inflamatórias, principalmente macrófagos, linfócitos T e neutrófilos, participam integralmente do processo angiogênico secretando citocinas que afetam as funções das CE, incluindo a proliferação, migração e ativação. Desse modo, a angiogênese é um importante processo que ocorre nas doenças inflamatórias, durante o crescimento tumoral e nas metástases. É o resultado de um balanço entre as atividades exercidas por reguladores positivos e negativos. O balanço da relação entre as células inflamatórias e o endotélio é muito similar ao balanço dos mediadores pró e antiinflamatórios que modulam uma resposta inflamatória apropriada (FOLKMAN, 1995; NALDINI; CARRARO, 2005).

Atualmente, a intrincada relação entre o endotélio e as células do sistema imune está bem estabelecida no contexto das respostas imunes. Contudo, está sendo altamente reconhecido o fato dessa inter-relação se estender além da regulação da resposta imune, considerando-se, particularmente, a influência do sistema imune no processo endotelial

essencial da angiogênese, onde a contribuição das citocinas guia o processo angiogênico (BENELLI et al., 2006).

Durante o processo de angiogênese (Figura 4), os tumores produzem e liberam fatores de crescimento angiogênico (proteínas) que se difundem nos tecidos próximos. Esses fatores de crescimento angiogênico se ligam a receptores específicos localizados nas CE vizinhas aos vasos sanguíneos preexistentes. Uma vez que o fator de crescimento se liga ao receptor, as CE se tornam ativadas. Sinais são enviados da superfície celular ao núcleo e a maquinaria da célula endotelial começa a produzir novas moléculas, incluindo enzimas. Essas enzimas criam pequenos orifícios na membrana basal que circunda os vasos sanguíneos. Então, as CE começam a proliferar e migram em direção ao tecido doente (tumor) através dos orifícios na membrana basal do vaso existente. Moléculas especializadas chamadas de moléculas de adesão ou integrinas servem de apoio e ajudam o novo vaso sanguíneo a crescer. Enzimas adicionais (matriz metaloproteinases ou MMPs) são produzidas para dissolver o tecido em frente à extremidade do vaso em desenvolvimento de maneira a acomodá-lo. Conforme os vasos sanguíneos se estendem, o tecido é remodelado ao redor do vaso. As CE em desenvolvimento enrolam-se para formar um novo vaso sanguíneo e vasos sanguíneos individuais se conectam, formando um circuito onde o sangue pode circular. Finalmente, vasos sanguíneos recém formados são estabilizados por células musculares especializadas (células de músculo liso, pericitos) que fornecem suporte estrutural. Então, o fluxo sanguíneo se inicia (PANDYA et al., 2006).

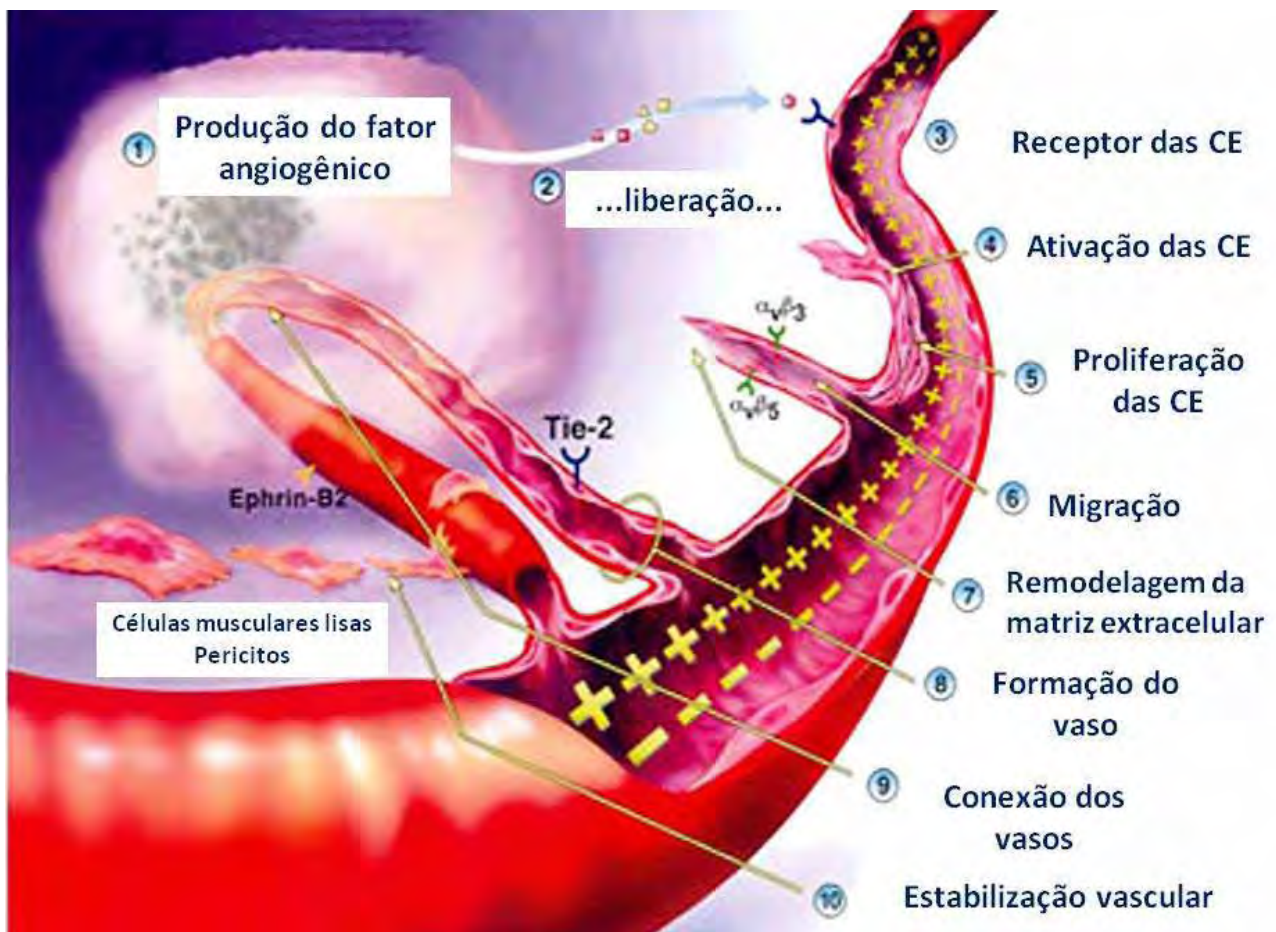


Figura 4. Esquema representativo do processo de angiogênese (Fonte: PANDYA et al., 2006).

É importante mencionar ainda que vários estudos recentes identificaram o fator nuclear- κ B (NF κ B) como um modulador chave na condução da inflamação ao câncer (LU et al., 2006). O NF κ B é um fator de transcrição que tem um importante papel na carcinogênese e também na regulação do sistema imunológico e da resposta inflamatória, induzindo a expressão de diversos genes que promovem a proliferação celular, regulam a apoptose, facilitam a angiogênese e estimulam a invasão e a metástase (LEE et al., 2007).

Relatos atuais, consistentes com o papel do NF κ B na oncogênese, citam que a inibição isolada deste fator de transcrição ou a inibição combinada com outras terapias

antitumorais levam à morte das células tumorais e inibição do crescimento do tumor (KIM, H.J. et al., 2006)

Desde as últimas décadas, a inibição da angiogênese tem sido reconhecida como uma promissora abordagem terapêutica para o controle do crescimento tumoral e metástases e ainda de doenças inflamatórias crônicas (FOLKMAN, 1995). Hoje, sabe-se que numerosos compostos bioativos derivados de plantas podem influenciar a atividade angiogênica de vários tipos celulares, podendo, desse modo, afetar a formação de vasos sanguíneos (LOBODA et al., 2005).

III - OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Dar continuidade ao estudo das atividades biológicas da planta *Alchornea glandulosa*, avaliando as atividades antiinflamatórias e antitumorais da fração acetato de etila, dos cinco compostos puros (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) e dos três extratos acetato de etila ALG- A, ALG-02 e ALG-03 obtidos de fungos endofíticos em experimentos utilizando-se culturas de macrófagos e linhagens tumorais murinas de câncer de mama (LM2) e pulmão (LP07).

Além disso, baseando-se na forte relação entre NO e angiogênese, as diversas etapas do processo de angiogênese foram estudadas utilizando-se os compostos que apresentaram bons resultados como inibidores do NO, isto é, a fração acetato de etila de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02, o alcalóide pteroginidina e o flavonóide afzelina.

3.2. Objetivos específicos

- analisar a produção e/ou inibição de NO por macrófagos em contato com os compostos.
- investigar a produção e/ou inibição das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 liberadas pelos macrófagos em contato com os compostos.
- determinar a atividade citotóxica dos compostos sobre as células tumorais.
- avaliar a taxa de inibição do crescimento dos tumores tratados com injeção intratumoral da fração acetato de etila e dos extratos de fungos endofíticos.

Posteriormente, os ensaios de angiogênese foram realizados utilizando-se células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) juntamente com os compostos na investigação da:

- viabilidade celular através da técnica de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT).
- proliferação celular através da incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).
- apoptose através da técnica de TUNEL.
- migração através de matrigel em placas de câmara dupla.
- formação de estruturas capilares em matrigel para a avaliação de vasos angiogênicos.
- ação dos compostos que tiveram os melhores resultados nos ensaios anteriores (fração acetato de etila de *A. glandulosa* e o alcalóide pteroginidina) sobre o fator de transcrição NFκB.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Etapa botânica

4.1.1. Coleta e identificação do material botânico

O material botânico foi coletado na Estação Experimental da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil, em março de 2005, pela Dra. Maria Cláudia Marx Young e identificado como folhas de *Alchornea glandulosa* Poepp & Endl. (Euphorbiaceae) pela Dra. Inês Cordeiro, pesquisadoras do Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo-SP. Brasil. Uma exsicata de número SP319257 encontra-se depositada no herbário “Maria Eneida P. Kaufmann” do mesmo instituto.

A planta *A. glandulosa* faz parte do Projeto Biota/BIOprospecTA - FAPESP ("Conservação e uso sustentável da biodiversidade do Cerrado e da Mata Atlântica: diversidade química e investigação do potencial biológico de substâncias micromoleculares e peptídeos - FASE II". Processo nº 03/02176-7).

4.2. Etapa química

4.2.1. Obtenção da fração e de compostos isolados da planta *A. glandulosa*

A obtenção da fração acetato de etila e dos compostos isolados da planta *A. glandulosa* foram realizados no Instituto de Química (UNESP/Araraquara) sob orientação da Prof. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva.

O material vegetal foi recebido e submetido aos procedimentos fitoquímicos pelo Dr. Luis Octávio Regasini, pesquisador do NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP – Araraquara, São Paulo-SP, Brasil.

As folhas de *A. glandulosa* foram secas à temperatura ambiente, sendo submetidas à moagem em moinho de facas. O pó obtido (1,5kg) foi levado à maceração

empregando hexano (3,5L x 3) e com posterior remaceração em metanol (4,2L x 3). O extrato metanólico foi concentrado em evaporador rotatório, rendendo um extrato bruto altamente viscoso (3,8 g) que foi diluído em uma mistura metanol:água (4:1, 200mL) e submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila (500mL x 5) e *n*-butanol (500mL x 5). Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida, cada fração de partição rendeu 2,5 g e 0,8 g, respectivamente.

A fração acetato de etila foi submetida à cromatografia de permeação de gel (Sephadex, LH-20) eluída isocraticamente em metanol, fornecendo 11 subfrações (A1-A11). A subfração A3 (330 mg) foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV) [C18, acetonitrila:água:ácido acético (87:12,5:0,5), $\lambda = 237$ nm; fluxo = 12 mL/min], conduzindo ao isolamento dos alcalóides guanidínicos, pteroginina (45 mg) e pteroginidina (183 mg). A subfração A8 (222 mg) foi submetida a CLAE-UV [C18, metanol : água : ácido acético (58:41,5:0,5), $\lambda = 254$ nm; fluxo = 14 mL/min], conduzindo ao isolamento dos flavonóides glicosilados, afzelina (32 mg) e isoquercitrina (77 mg). A subfração A11 (48 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica eluída em gradiente de clorofórmio: metanol (100 – 75 % de metanol), permitindo o isolamento de ácido gálico (9,0 mg) (Figura 5).

A identificação das substâncias de *A. glandulosa* foi baseada na análise dos seus espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , bem como por comparação com dados da literatura.

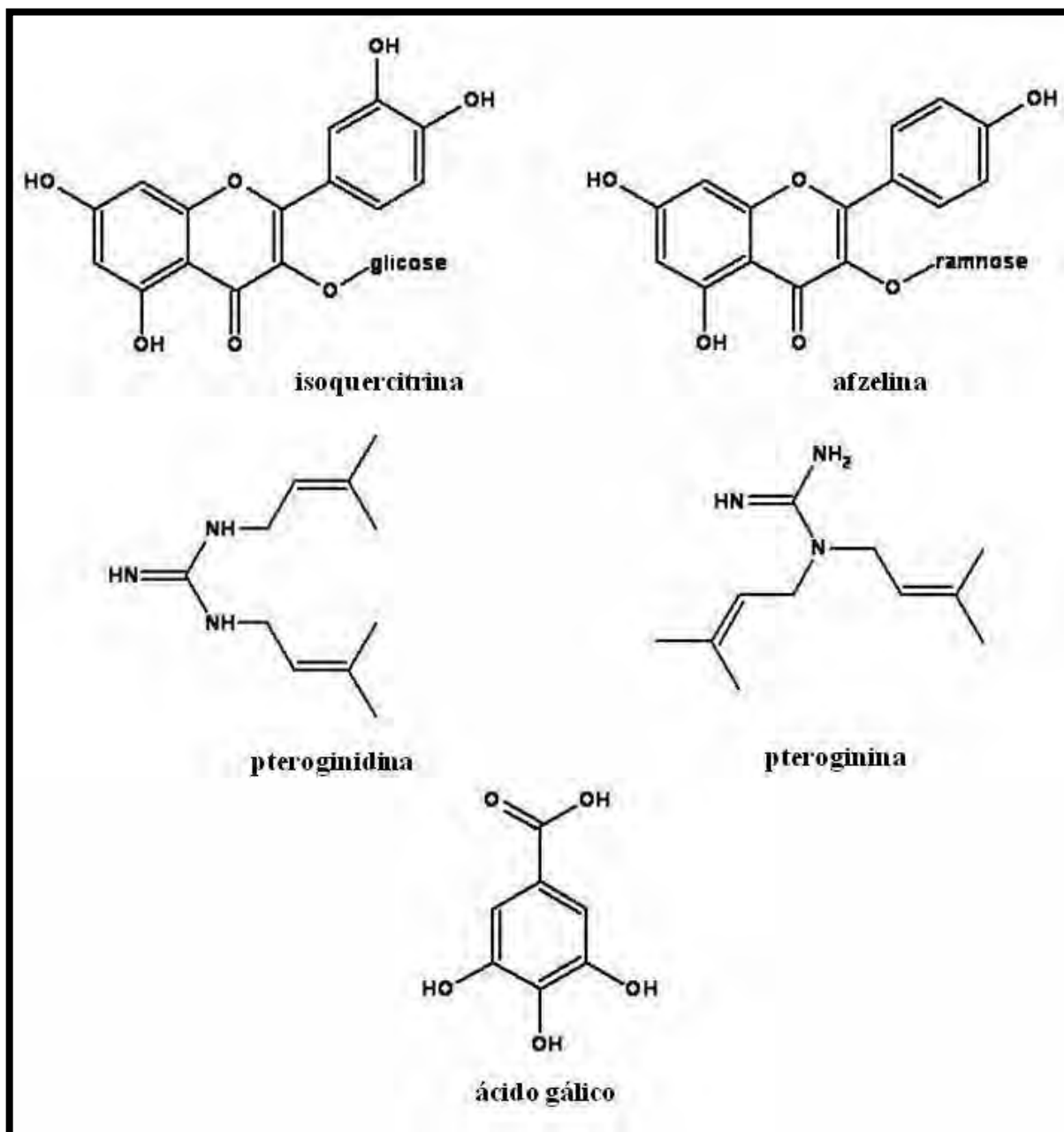


Figura 5. Estruturas moleculares de substâncias obtidas de *Alchornea glandulosa*.

4.2.2. Obtenção dos extratos acetato de etila a partir de fungos endofíticos isolados das folhas de *Alchornea glandulosa*

A obtenção dos extratos acetato de etila a partir de fungos endofíticos isolados das folhas de *A. glandulosa* foi realizada no Instituto de Química (UNESP/Araraquara) sob orientação da Prof. Dr^a. Ângela Regina Araújo.

4.2.2.1. Obtenção da cepa fúngica

Os fungos endofíticos foram isolados de folhas saudáveis de *Alchornea glandulosa*. As folhas da planta foram lavadas com água e sabão e, posteriormente, esterilizadas em banhos subsequentes de hipoclorito de sódio 1% (5 minutos), de etanol 70% (1 minuto) e água destilada (10 minutos) para retirada de microrganismos epifíticos.

Após esse processo de esterilização, as folhas foram cortadas e incubadas em placas de Petri contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA), as quais foram adicionadas o antibiótico sulfato de gentamicina (50 mg/mL) para evitar crescimento de bactérias contaminantes. Repiques sucessivos em placas de Petri contendo PDA resultaram no isolamento de três linhagens codificadas como ALG-A, ALG-02, ALG-03 (Figura 6).



Figura 6. Fungos endofíticos isolados das folhas da planta *Alchornea glandulosa* e codificados como ALG-A, ALG-02 e ALG-03.

4.2.2.2. Repique das linhagens fúngicas para crescimento em meio de cultura líquido

As linhagens ALG-A, ALG-02 e ALG-03 preservadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido Potato Dextrose Agar (PDA) e após período de incubação de 7 dias, o meio sólido contendo o micélio de cada fungo foi repicado e inoculado em meio líquido Potato Dextrose Broth (PDB) (400mL para a produção em pequena escala e 8 L para a produção em larga escala) e cultivado sob aeração por 28 dias.

4.2.2.3. Obtenção dos extratos acetato de etila das culturas

Após o período de 28 dias de crescimento, os meios líquidos aquosos contendo os metabólitos secretados pelos fungos foram separados dos micélios por filtração e submetidos à partição líquido/líquido com acetato de etila. O solvente orgânico foi recuperado por destilação em evaporador rotatório a pressão reduzida, fornecendo os extratos acetato de etila.

4.2.2.4. Preparo das amostras

Todos os compostos utilizados nesta tese foram primeiramente diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para a realização dos ensaios. Foram preparadas soluções-mãe para todos os compostos testados. Nos ensaios de NO, citocinas, atividade antiproliferativa, análise morfológica das células tumorais e avaliação de tumores *in vivo* foram utilizados no máximo 1% de DMSO para o preparo da solução-mãe. A partir da solução-mãe foram feitas diluições seriadas em meio de cultura RPMI-1640 livre de soro fetal bovino (FBS). Nos ensaios de angiogênese utilizando-se culturas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) foram utilizados no máximo 0,1% de

DMSO para o preparo da solução-mãe. Em seguida essa solução foi diluída no meio de cultura M199 livre de FBS e contendo suplemento para células endoteliais (Endothelial cell growth supplement - ECGS).

4.3. Etapa biológica

4.3.1. Linhagens celulares

4.3.1.1. Células LP07

A linhagem tumoral de adenocarcinoma de pulmão murino LP07 foi cedida pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina. Esta linhagem é derivada do tumor P07 que foi mantido por diversas passagens subcutâneas em camundongos. A partir da linhagem *in vivo*, se obteve a linhagem *in vitro* chamada LP07. Esse mesmo tipo de tumor é produzido pelo cigarro em humano. Essas células se metastatizam espontaneamente no pulmão com alta frequência. Tanto as células P07 quanto LP07 produzem síndromes paraneoplásicas como hiperleucocitose, por produção de fator estimulador de colônias granulocíticas e monocíticas (GM-CSF), hipercalcemia e caquexia.

4.3.1.2. Células LM2

A linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino LM2 foi cedida pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina. Essa linhagem é derivada de uma fêmea BALB/c reprodutora e foi mantida por passagens subcutâneas (M2) em camundongos da qual se obteve a linhagem *in vitro* (LM2). É um tumor muito indiferenciado que cresce rapidamente. Além disso, metastatiza muito pouco em animais experimentais.

4.3.1.3. Culturas celulares

As linhagens celulares foram mantidas em meio MEM (“Minimal Essential Medium”) (Gibco, USA), suplementadas com 10% de FBS e gamicina, a 37°C com 7,5% dióxido de carbono (CO₂).

4.3.2. Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas de 8 semanas, pesando entre 18 e 25 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina) *ad libitum* em local climatizado (23° ± 2°C, 56 ± 2% de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas.

4.3.3. Testes *in vitro*

4.3.3.1. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os animais foram previamente inoculados intraperitonealmente, com 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3%. Após 72 horas de estímulo, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. O peritônio foi exposto em fluxo laminar horizontal classe 100 (Veco) para a retirada do exsudato peritoneal. Na porção mediana superior do abdômen foi injetado 5,0mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril em pH 7,2 e a 4°C, com auxílio de seringa e agulha também estéreis. Uma leve massagem manual foi realizada e as células do exsudato peritoneal foram coletadas com a mesma seringa e dispensadas em tubo cônico estéril (Corning, Inc.) para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5mL de PBS (pH 7,2) e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos em centrífuga (Fanem) à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma)

contendo 5% de FBS, 2-mercaptoetanol ($2 \times 10^{-5} \text{M}$), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100U/mL) e L-glutamina (2mM) e assim designado como meio completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocimétrica de Neubauer (Boeco, Germany) com a utilização de Azul de Tripán. As células foram ajustadas à concentração ideal para cada ensaio em meio RPMI-1640-C. Posteriormente, as células do exsudato peritoneal foram colocadas em placas e incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 7,5% de CO₂ (Forma Scientific) para a aderência de macrófagos. As células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640.

4.3.3.2. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação das citocinas. As células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado 1,0mL da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 7,5% de CO₂. Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640.

Na avaliação da produção citocinas foi adicionado 1mL de RPMI-1640-C e 1mL das amostras obtidas da planta e dos fungos endofíticos aos macrófagos que ficaram aderidos a placa. Além disso, foram adicionados aos macrófagos de alguns orifícios da placa, LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo O111:B4 - Difco) a 1 µg/mL (1mL) e meio de cultura RPMI-1640-C (1mL), utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Nos ensaios de inibição da produção de citocinas foram adicionados conjuntamente 1mL de RPMI-1640-C, 1mL das amostras obtidas da planta e dos fungos endofíticos e 1mL de LPS a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aos macrófagos que ficaram aderidos à placa. Da mesma forma, LPS a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1mL) foi utilizado como controle positivo e somente RPMI-1640-C (1mL) como controle de negativo. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 7,5% de CO₂ por mais 24 h. Após esta incubação, o conteúdo das placas foi transferido para *ependorfs* que foram, em seguida, centrifugados a 7800 \times g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados em *ependorfs* e estocados em freezer a -80° C até o momento da determinação da citocina através do teste imunoenzimático ELISA de captura.

4.3.3.3. Ensaios de viabilidade dos macrófagos

A avaliação da viabilidade dos macrófagos foi realizada em fases distintas. Em uma primeira fase, os macrófagos peritoneais de camundongos foram incubados com as amostras obtidas a partir da planta e dos fungos. Em uma segunda fase, macrófagos foram estimulados por LPS a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e também incubados com essas mesmas amostras.

Os experimentos foram realizados utilizando-se a técnica de MTT (MOSMANN, 1983). Em uma placa de microtitulação de 96 cavidades, foram incubadas suspensões de células do exsudato peritoneal (100 μL por cavidade), na concentração de 5x10⁶ células/mL, por 60 minutos para a aderência das células. Os macrófagos aderentes, estimulados ou não com LPS, foram incubados novamente junto com as preparações obtidas a partir dos compostos da planta e dos fungos. O tempo de incubação foi 24 horas. Após o tempo de incubação, o conteúdo da placa foi vertido e 100 μL de solução de MTT (Sigma) a 1mg/mL foi adicionado a cada orifício. A placa

foi então incubada por mais 3 h nas mesmas condições anteriores. Após esse período, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100µL de álcool isopropílico (Mallinckrodt) foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazana formados. Somente células e meio de cultura RPMI-1640 foram utilizados como controle, equivalendo a 100% de viabilidade dos macrófagos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

4.3.3.4. Determinação da produção de NO

O óxido nítrico, quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura, foi medido espectrofotometricamente usando reagente de Griess com nitrito de sódio (NaNO₂) como padrão (GREEN et al., 1982).

Em cada orifício de uma placa de 96 cavidades foram adicionados 100µL de uma suspensão celular ajustada na concentração de 5x10⁶ células/mL. Após a aderência das células, a placa foi incubada somente com meio de cultura RPMI-1640 (controle negativo) ou com 100µL das amostras obtidas a partir da planta e dos fungos endofíticos ajustadas nas concentrações indicadas na Tabela 1, por 24 h a 37°C em estufa com tensão constante de 7,5% de CO₂. Como controle positivo, foi utilizado 100µL de uma solução de LPS a 1 µg/mL. Após a incubação, alíquotas de 100µL do sobrenadante da cultura foram misturadas com 100µL do reagente de Griess (sulfanilamida 0,1%; N-naftil-etilenodiamino 0,1% e ácido fosfórico a 3%). Após 10 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 540 nm em leitor de ELISA (Multiskan, Labssystem, Finlândia). Os dados foram expressos como µmols/mL através de curva-padrão obtida anteriormente com concentrações molares conhecidas de NaNO₂ (Merck) em meio RPMI-1640.

4.3.3.5. Determinação da inibição da produção de NO

Células do exsudato peritoneal, na concentração de 5×10^6 células/mL, foram utilizadas. Após a aderência, os macrófagos foram incubados em presença de 100µL de solução de LPS (1µg/mL) e 100µL das amostras obtidas a partir da planta e dos fungos endofíticos (Tabela 1). A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 7,5% de CO₂. A produção de NO foi medida espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito no meio de cultura com a utilização do reagente de Griess de acordo com o item anterior.

4.3.3.6. Determinação das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12

As citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12 foram quantificadas no sobrenadante obtido da cultura de macrófagos como descrito no item 4.3.3.2. através do teste imunoenzimático ELISA, utilizando Kit BD OptEIA (BD Biosciences Pharmingen) de acordo com as instruções do fabricante. As microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Corning Inc., NY) foram adsorvidas com um anticorpo de captura anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6 ou anti-IL-12 e incubadas “overnight” à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS (pH 9,5) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, foram bloqueadas com PBS contendo 10% de FBS (PBS-FBS) e mantidas a temperatura ambiente por 60 minutos. A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e 100µl de cada citocina padrão ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados foram adicionados as placas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas 5 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 µL de anticorpo monoclonal anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6 ou anti-IL-12 marcado com biotina e diluído na concentração adequada de cada citocina em PBS-FBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e lavadas

5 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 µl do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS-FBS. As placas foram incubadas novamente a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas 7 vezes com PBS-T e 100 µl do substrato BD OptEIA TMB Substrate (BD Biosciences Pharmingen) foram adicionados em cada cavidade. Após nova incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A absorbância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/visível de microplacas (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) e as concentrações das citocinas foram obtidas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12 padrão. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picogramas/mL.

4.3.3.7. Cálculo da porcentagem de inibição

Foram calculadas as porcentagens de inibição, através de comparação com os controles, nos experimentos onde as amostras obtidas da planta e dos fungos endofíticos apresentaram efeitos inibitórios sobre a produção de NO e das citocinas. A equação abaixo foi utilizada para o cálculo.

Onde A, B e C correspondem a:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\mathbf{A - B}}{\mathbf{A - C}} \times 100$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \mathbf{A} = \text{LPS (+), extrato, fração ou composto isolado (-)} \\ \mathbf{B} = \text{LPS (+), extrato, fração ou composto isolado (+)} \\ \mathbf{C} = \text{LPS (-), extrato, fração ou composto isolado (-)} \end{array} \right.$$

Além disso, foi calculado o potencial antiinflamatório de cada composto através da média dos valores de porcentagem de inibição nos ensaio de NO, TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12.

4.3.3.8. Determinação da atividade citotóxica dos compostos nas linhagens tumorais murinas LM2 e LP07

A avaliação da atividade dos compostos obtidos da planta e dos fungos endofíticos sobre o crescimento celular foi realizada utilizando-se duas linhagens tumorais murinas cedidas pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina: a linhagem LM2 (adenocarcinoma de mama) e a linhagem LP07 (adenocarcinoma de pulmão).

A atividade citotóxica foi determinada baseando-se na capacidade das células vivas reduzirem o MTT (Mosmann, 1983). As células das diferentes linhagens tumorais foram lavadas com PBS (pH 7,2), tripsinizadas e transferidas para placas de 96 orifícios na concentração de 3×10^4 cell/mL. Uma alíquota de 190 μ L da suspensão celular foi adicionada em cada poço da placa e então a placa foi incubada a 37 °C com 7,5% CO₂ por 24h para permitir a estabilização das células antes da adição dos compostos. Após esse período, os poços da placa foram novamente lavados com PBS (pH 7,2) e 10 μ L de diferentes concentrações dos compostos isolados da planta e do fungo (de 0,1 a 200 μ g/mL) foram adicionados a cada poço. Então, a placa foi novamente incubada por 48h nas mesmas condições anteriores e doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após a incubação, os poços foram novamente lavados com PBS e meio fresco contendo 1mg/mL of MTT foi adicionado. Após 3h, o meio foi removido e 100 μ L de álcool isopropílico (Mallinckrodt) foi adicionado para solubilizar os cristais de formazana formados. A absorbância foi medida a 540nm com filtro de referência de 620nm em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems). Os valores de 50% da concentração inibitória para o crescimento celular (IC₅₀) foram expressos como a concentração resultante em 50% da redução do crescimento das células tumorais e foram calculadas através de regressão linear utilizando o programa Origin 5.0.

4.3.3.9. Avaliação da angiogênese

Essa parte do projeto foi realizada em um estágio no exterior (PDEE) sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Raquel Soares na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (Portugal).

4.3.3.9.1. Células

Culturas de células HUVEC foram mantidas em meio M199 (Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de FBS, 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), 0,01% de heparina e 30 µg/ml de ECGS em estufa a 37° C com 5% de CO₂. As células foram colocadas em placas revestidas com 0,2% de gelatina (Sigma).

4.3.3.9.2. Ensaios de viabilidade das células HUVEC

Foram realizados ensaios de viabilidade das células HUVEC (2×10^4) previamente incubadas com o(s) composto(s) através da técnica de MTT de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.3.3., utilizando-se DMSO para solubilizar os cristais de formazana formados.

4.3.3.9.3. Ensaios de proliferação com BrdU

A proliferação celular foi avaliada através da incorporação de BrdU. Essa incorporação celular de BrdU ocorre durante a fase S e pode ser prontamente detectada através de anticorpos específicos anti-BrdU após a permeabilização da membrana. A quantificação subsequente das células positivas é possível através de técnica de imunohistoquímica.

Os ensaios de proliferação foram realizados utilizando-se o kit BrdU *In-Situ* Detection Kit (BD Pharmingen™) de acordo com as instruções do fabricante. Desse

modo, as células HUVEC (5×10^4) previamente incubadas com o(s) composto(s) foram fixadas em lâminas por 15 minutos com o tampão de fixação e em seguida lavadas com PBS (pH 7,4). A seguir, foram incubadas por 30 minutos com tampão diluente para a permeabilização das células. As células foram então lavadas novamente com PBS (pH 7,4) e incubadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,3% por 10 minutos para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Após nova lavagem com PBS (pH 7,4), a recuperação antigênica foi realizada utilizando-se a solução de trabalho BD™ Retrieven A. Nova lavagem com PBS (pH 7,4) foi feita e a seguir o anticorpo biotilado anti-BrdU foi aplicado. Após incubação por 1 hora, foi realizada nova lavagem com PBS (pH 7,4) e foi adicionado estreptavidina-HRP. Após incubação por 30 minutos e nova lavagem com PBS (pH 7,4), o substrato diaminobenzidina (DAB) foi acrescentado e incubado por 5 minutos. Após lavagem com água, foi feita a contracoloração com hematoxilina. Os resultados foram expressos como porcentagem de células proliferantes (média \pm desvio padrão). A porcentagem de células proliferantes foi avaliada em microscópio (aumento de 200X). Um total de mil núcleos foi contado em cada lâmina. Cinco experimentos independentes foram realizados.

4.3.3.9.4. Avaliação da apoptose através da técnica de TUNEL

Células endoteliais (2×10^4) foram cultivadas em lamínulas revestidas com 0,2% de gelatina e a seguir incubadas com os compostos por 24h. A técnica de TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling”) foi realizada utilizando-se o kit “In Situ Cell Death Detection” (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células endoteliais previamente incubadas com os compostos foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida,

foi feita uma lavagem com PBS (pH 7,4) e as células foram permeabilizadas com tampão de permeabilização por 2 minutos. Após esse tempo foi feita nova lavagem com PBS (pH 7,4) e os controles positivos foram incubados com 2µl de DNase/ 100µL de TrisHCL 50mM, pH7.5, durante 5 minutos. O controle positivo foi lavado com PBS (pH 7,4). Então, foi feita a incubação com solução de TUNEL por 60 minutos a 37°C em câmara úmida. Após nova lavagem com PBS (pH 7,4), as células foram fixadas em metanol e incubadas em 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) por 5 minutos. Foi feita nova lavagem com PBS (pH 7,4) e lâminas foram montadas com solução salina e glicerol. As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i (aumento de 200X). A apoptose foi determinada como uma porcentagem de células positivas coradas com solução de TUNEL em 1000 células com núcleos corados com DAPI.

4.3.3.9.5. Ensaio de invasão

Os ensaios de invasão foram realizados em câmara dupla utilizando-se matrigel (BD “Biocoat Matrigel Invasion Chamber”). As células endoteliais foram semeadas em “inserts” na concentração de 1×10^4 , em meio sem FBS. No poço inferior foi colocado meio completo e no poço superior os respectivos compostos. As culturas foram colocadas na estufa a 37°C durante 24h. Após lavagem com PBS (pH 7,4), as células que se encontravam no poço superior (“insert”) foram fixadas com metanol a -20°C e os seus núcleos corados com DAPI. As células que migraram através da membrana de matrigel que separa as duas câmaras (superior e inferior) foram visualizadas e quantificadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 50i).

4.3.3.9.6. Avaliação da formação de estruturas tipo capilares pelas células endoteliais

Foram utilizadas células endoteliais para avaliar o efeito dos compostos em vasos constituídos apenas por endotélio (vasos angiogênicos). Dessa forma, primeiramente a matriz GFR-matrigel (BD Biosciences) foi descongelada a 4°C “overnight” e as pipetas, placas e tubos necessários para a realização da técnica foram previamente resfriados. O gel foi colocado em placas de 96 poços em gelo. Posteriormente, as placas foram colocadas na estufa a 37°C durante 30 minutos para o gel polimerizar. As células endoteliais foram então contadas utilizando-se Azul de Tripán em câmara de Neubauer e, em seguida, colocadas nas placas cobertas com matrigel na concentração de 1×10^4 células/ mL em meio com os respectivos compostos. Após 24h o número de estruturas capilares formadas em cada poço foi avaliado em microscópio invertido (aumento de 40X) e fotomicrografias foram feitas em microscópio de contraste de fase. Cada porção de estrutura capilar entre as ramificações foi considerada como uma unidade. A média foi obtida através da avaliação de toda a cultura em cada poço da placa que foi submetido ao mesmo tratamento. Uma semiquantificação das estruturas capilares foi realizada de acordo com Soares et al. (2004).

4.3.3.9.7. Extração das proteínas de células HUVEC tratadas com os compostos

Culturas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) foram incubadas com os compostos por 24 horas. Após esse período o meio de cultura foi decantado e 1mL de TriPure (Roche) à temperatura ambiente foi adicionado. O lisado foi então transferido para um tubo Falcon onde foram adicionados 0,2mL de clorofórmio. Após agitação e incubação do tubo à temperatura ambiente por 10 minutos,

a amostra foi centrifugada a 12000 \times g por 15 minutos a 4°C para a separação da solução em fases distintas. Em seguida, a fase aquosa incolor foi totalmente removida e 0,3mL de etanol 100% foram adicionados. Após nova agitação e incubação do tubo à temperatura ambiente por 3 minutos, a amostra foi centrifugada a 2000 \times g durante 5 minutos a 4°C. Então, o sobrenadante que contém fenol, etanol e proteínas foi separado e 1,5mL de isopropanol foi adicionado. O tubo foi novamente agitado e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos para a precipitação das proteínas. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 8500 \times g durante 10 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante, o pellet de proteínas foi ressuspensionado em 2mL de hidrocloreto de guanidina/etanol a 95%. Após essa etapa, a amostra foi agitada e incubada à temperatura ambiente durante 20 minutos. Foi então centrifugada a 7500 \times g durante 5 minutos a 4°C. Então, 2mL de etanol a 100% foi adicionado e novamente a amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 20 minutos e centrifugada como na etapa anterior. Por fim, o sobrenadante foi retirado e o pellet seco à temperatura ambiente para retirar o excesso de etanol. Em seguida, o pellet foi dissolvido em 1% de SDS e as proteínas foram quantificadas em espectrofotômetro a 562nm.

4.3.3.9.8. Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando-se o kit BCA protein assay (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.3.9.9. Determinação da atividade do NFκB

A atividade do NFκB foi determinada por ELISA utilizando-se as proteínas extraídas das células HUVEC e o kit TransAM NFκB p50 “transcription factor assay” (Active Motif, CA, USA). Foram adicionadas a uma placa de 96 poços contendo

oligonucleotídeos imobilizados 20µg de proteínas. As amostras foram incubadas com o anticorpo primário contra a subunidade p50 do NFκB e em seguida incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A seguir, a placa é incubada com uma solução de desenvolvimento. Após a adição de uma solução de parada, a quantificação foi feita a 450nm e 650nm utilizando-se um espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascent, USA). Extrato nuclear de células Raji e oligonucleotídeos biotinizados foram utilizados como controles positivos.

4.3.4. Ensaio *in vivo*

4.3.4.1. Inoculação das células tumorais LM2 e LP07 nos camundongos

Foram inoculadas cerca de 200.000 células em 0,1mL de meio de cultura MEM sem FBS subcutaneamente no flanco esquerdo dos animais (Balb/c fêmeas). Os animais foram divididos em dois grupos, um grupo foi inoculado com as células LM2 e outro com as células LP07.

4.3.4.2. Inoculação intratumoral da fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e dos extratos dos fungos endofíticos

A fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e os extratos dos fungos endofíticos foram inoculadas nos tumores dos animais. Os ensaios *in vivo* foram realizados apenas com a fração e os extratos dos fungos endofíticos uma vez que as quantidades disponíveis desses compostos eram superiores às quantidades das substâncias puras isoladas da planta. Cada grupo de 4 animais (controle, fração *A. glandulosa*, ALG-A, ALG-02, ALG-03) recebeu a inoculação intratumoral de fração ou de um extrato, totalizando 5 grupos com as células LM2 e 5 grupos com as células LP07. O grupo controle recebeu apenas injeção intratumoral de meio MEM. A

inoculação de 0,1mL foi feita quando o tumor estava pequeno, aproximadamente 5mm de comprimento, avaliado com o uso de paquímetro (Mitutoyo). A concentração da fração e dos extratos de fungos endofíticos administrados através de injeção intratumoral foi definida baseando-se no valor de IC₅₀ obtido através do ensaio 4.3.3.8. A concentração dos compostos utilizados nos ensaios *in vivo* foi estabelecida como sendo dez vezes o valor do IC₅₀ obtido nos ensaios *in vitro*. Além disso, o peso dos camundongos também foi acompanhado.

4.3.4.3. Obtenção dos tumores e avaliação do crescimento tumoral

Dez dias após a inoculação da fração ou dos extratos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Caso o volume do tumor excedesse a 2cm³ antes dos dez dias, o experimento seria encerrado.

Em seguida, os tumores foram removidos e pesados e o volume foi medido. O volume do tumor foi determinado pela medida do maior diâmetro (a) e do menor diâmetro (b) do tumor e foi calculado de acordo com a fórmula (SAWAOKA et al, 1999):

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = 0.5 \times a \times b^2$$

A taxa de inibição também foi calculada utilizando-se a fórmula a seguir:

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = (1,0 - \text{volume do tumor do grupo tratado} / \text{volume do tumor do grupo controle}) \times 100\%$$

4.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnett de acordo com o programa Graphpad InStat versão 3.05. O nível de significância foi de 5%, ou seja, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.5. Tratamento e descarte de resíduos

Os resíduos biológicos tiveram coleta e descarte seletivos, realizados por uma firma especializada que vem à Faculdade de Ciências Farmacêuticas em intervalos regulares para a coleta. O Instituto de Química dispõe de um laboratório para tratamento e descarte de resíduos. Solventes orgânicos foram enviados para descarte em firmas especializadas.

4.6. Bioética

Os animais foram mantidos em estantes adequadas, com condições estáveis de ambiente ($23 \pm 2^\circ \text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar) e ciclos de 12 horas com e sem luz. Os animais receberam água e ração (Purina) *ad libitum*. Foram adotadas técnicas adequadas para o manuseio e sacrifício dos animais, procurando assim minimizar ao máximo o sofrimento animal. Não foi utilizado um número exagerado de animais em cada teste, apenas uma quantidade mínima ideal para a execução da metodologia e para as análises estatísticas.

O protocolo para uso de animais nesta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade (Parecer nº 02/2006).

V – RESULTADOS

5.1. Avaliação da viabilidade dos macrófagos

A avaliação da viabilidade dos macrófagos foi realizada em fases distintas utilizando-se a técnica de MTT. Em uma primeira fase, os macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c foram incubados com as preparações obtidas a partir dos extratos dos fungos endofíticos e também com a fração acetato de etila e os compostos isolados da planta *A. glandulosa* e em uma segunda fase, os macrófagos foram incubados com essas mesmas preparações e estimulados por LPS a 1 µg/mL. Quando foram comparadas as mesmas concentrações de cada composto, com ou sem a presença de LPS, observou-se que os valores de viabilidade possuem diferenças estatisticamente significativas apenas nas maiores concentrações dos compostos (Figuras 7 e 8).

A partir dos resultados encontrados nos ensaios de citotoxicidade, foram determinadas as concentrações ideais de cada extrato, fração e substância pura a serem utilizadas nos ensaios de determinação de NO e citocinas, estabelecendo-se que seriam utilizadas as concentrações mais altas e menos citotóxicas aos macrófagos de cada composto (Tabela 1).

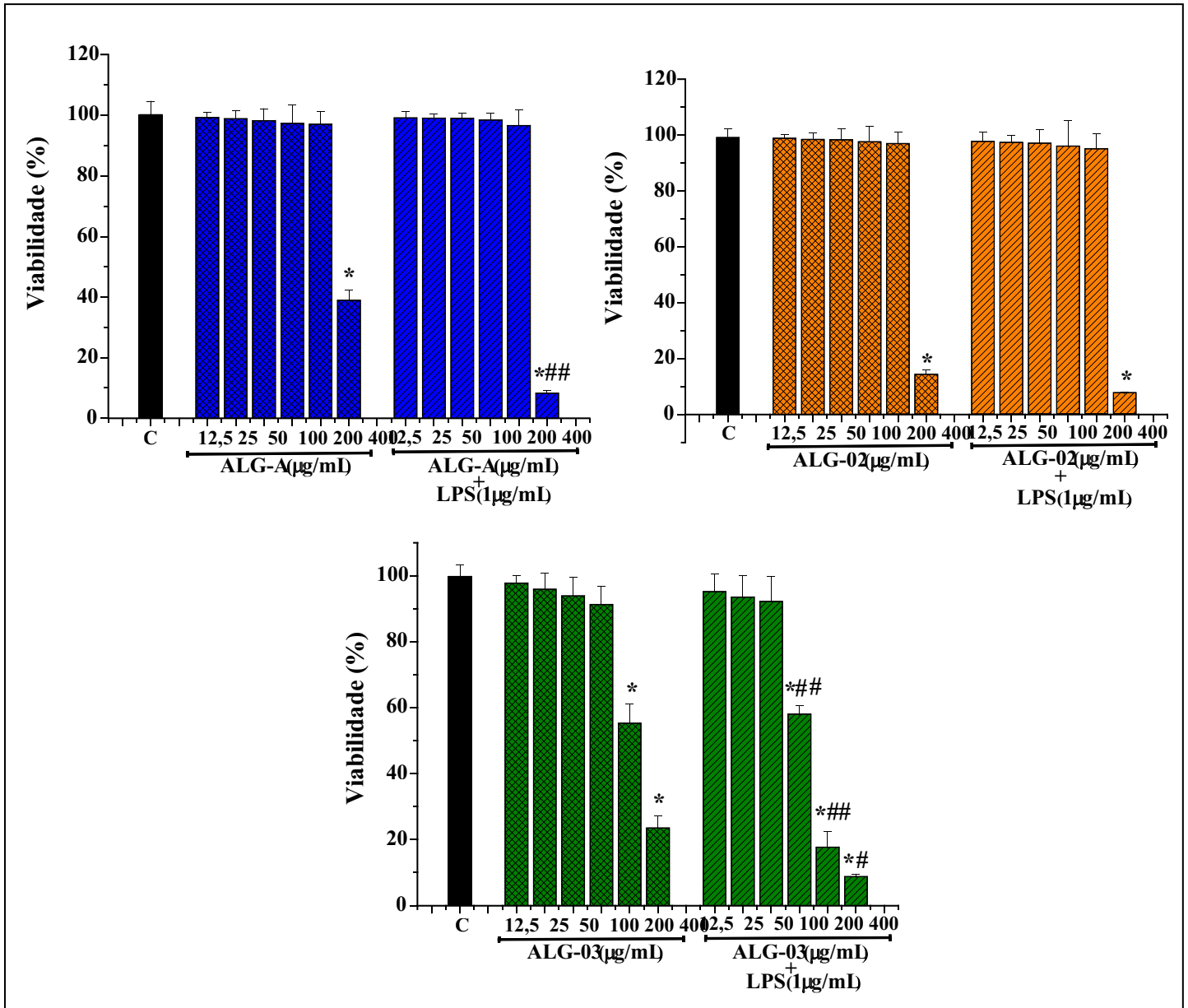


Figura 7. Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados e não estimulados por LPS na presença de diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle (C), equivalendo a 100% de viabilidade.

* p < 0,01 quando comparado ao controle (C).

p < 0,01 e ## p < 0,001 quando comparado as mesmas concentrações com e sem LPS.

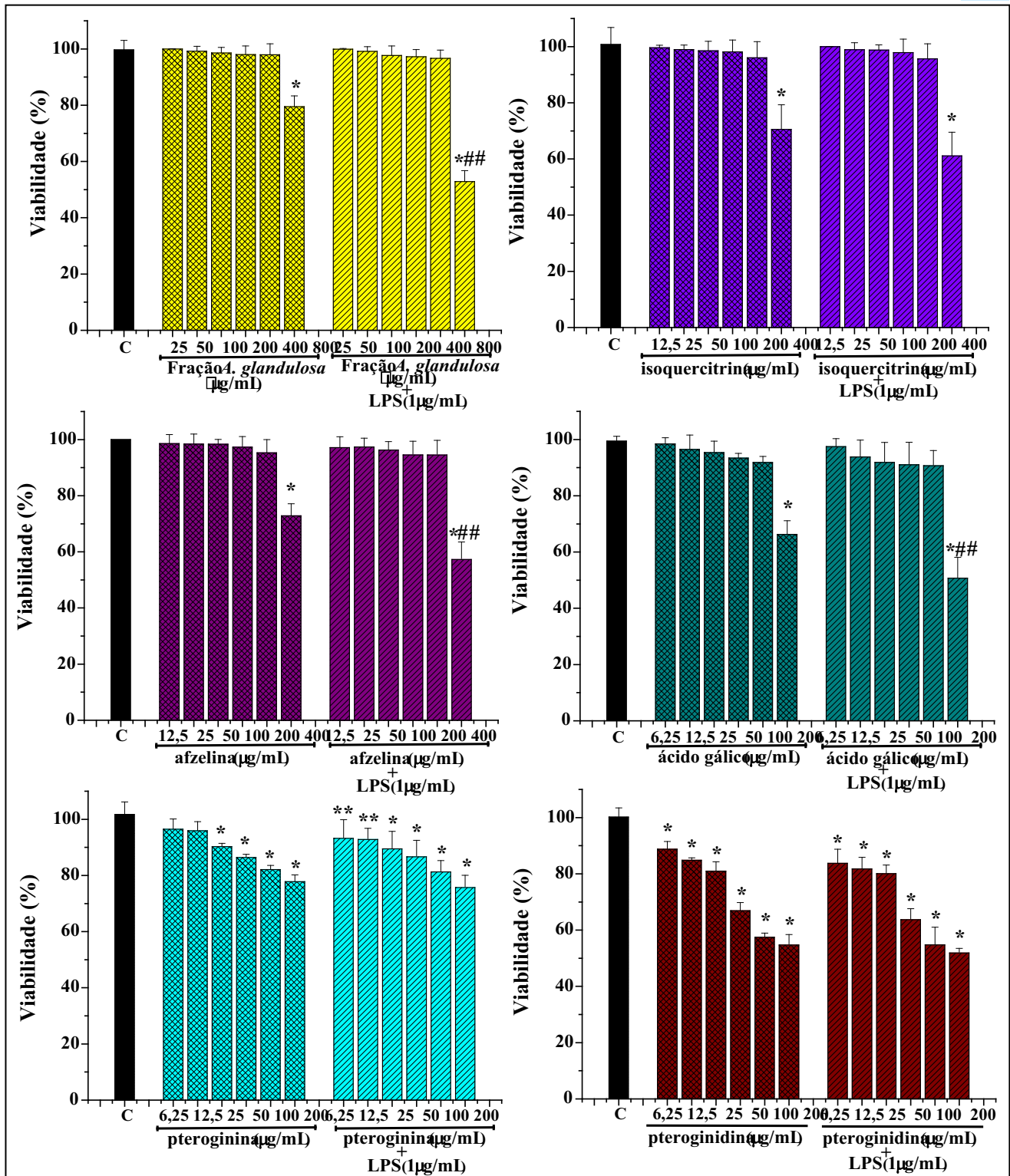


Figura 8. Viabilidade de macrófagos peritoneais estimulados e não estimulados por LPS na presença de diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina). As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle (C), equivalendo a 100% de viabilidade. * p<0,01; ** p<0,05 quando comparado ao controle (C). # p<0,01; ## p<0,001 quando comparado as mesmas concentrações na ausência e presença de LPS.

Tabela 1: Concentrações dos extratos, da fração e das substâncias puras utilizadas nos ensaios de determinação de NO e citocinas e determinadas pela técnica de MTT.

Composto	Concentrações utilizadas nos ensaios		
	(µg/mL)		
ALG-A (extrato acetato de etila)	200	100	50
ALG-02 (extrato acetato de etila)	200	100	50
ALG-03 (extrato acetato de etila)	50	25	12,5
Fração acetato de etila - <i>A. glandulosa</i>	400	200	100
isoquercitrina	200	100	50
afzelina	200	100	50
ácido gálico	100	50	25
pteroginina	100	50	25
pteroginidina	25	12,5	6,25

5.2. Determinação da produção/ inibição de NO.

As preparações obtidas a partir dos extratos dos fungos endofíticos e também da fração acetato de etila e dos compostos isolados da planta *A. glandulosa* não induziram a produção de NO (Tabela 2) em todas as concentrações testadas. Contudo, essas mesmas preparações demonstraram ser potentes inibidoras da produção de NO em macrófagos ativados por LPS (Figuras 9 e 10). A porcentagem de inibição de NO foi calculada e os resultados encontrados estão descritos na Tabela 3. Houve uma forte inibição da produção de NO em todas as preparações testadas, mas o extrato de fungo endofítico ALG-02, o alcalóide pteroginidina, a fração acetato de etila de *A. glandulosa* e o flavonóide afzelina obtiveram os melhores resultados. Em todas as amostras a inibição foi dose-dependente.

Tabela 2. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos na produção de NO em macrófagos não estimulados por LPS.

Compostos ($\mu\text{g/mL}$)	RPMI	PRODUÇÃO DE NO ($\mu\text{mols/mL}$)							
		6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	1,70 \pm 0,34	-	-	-	1,69 \pm 0,18	1,36 \pm 0,31	1,32 \pm 0,24	-	
<i>ALG-02</i>	1,74 \pm 0,24	-	-	-	1,57 \pm 0,30	1,64 \pm 0,16	1,78 \pm 0,42	-	
<i>ALG-03</i>	2,01 \pm 0,57	-	1,84 \pm 0,05	2,11 \pm 0,26	2,13 \pm 0,60	-	-	-	
<i>fração</i>	2,62 \pm 0,17	-	-	-	-	2,48 \pm 0,46	2,07 \pm 0,42	2,57 \pm 0,46	
<i>isoquercitrina</i>	1,58 \pm 0,33	-	-	-	1,68 \pm 0,11	1,95 \pm 0,13	1,80 \pm 0,19	-	
<i>afzelina</i>	1,99 \pm 0,19	-	-	-	1,89 \pm 0,13	1,69 \pm 0,21	1,71 \pm 0,45	-	
<i>ácido gálico</i>	2,62 \pm 0,17	-	-	2,40 \pm 0,49	2,57 \pm 0,39	2,84 \pm 0,60	-	-	
<i>pteroginina</i>	1,90 \pm 0,07	-	-	1,87 \pm 0,50	1,56 \pm 0,34	1,58 \pm 0,36	-	-	
<i>pteroginidina</i>	2,00 \pm 0,44	2,09 \pm 0,25	2,66 \pm 0,19	2,29 \pm 0,67	-	-	-	-	

Cada valor representa a média \pm desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata. Valores não estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (RPMI).

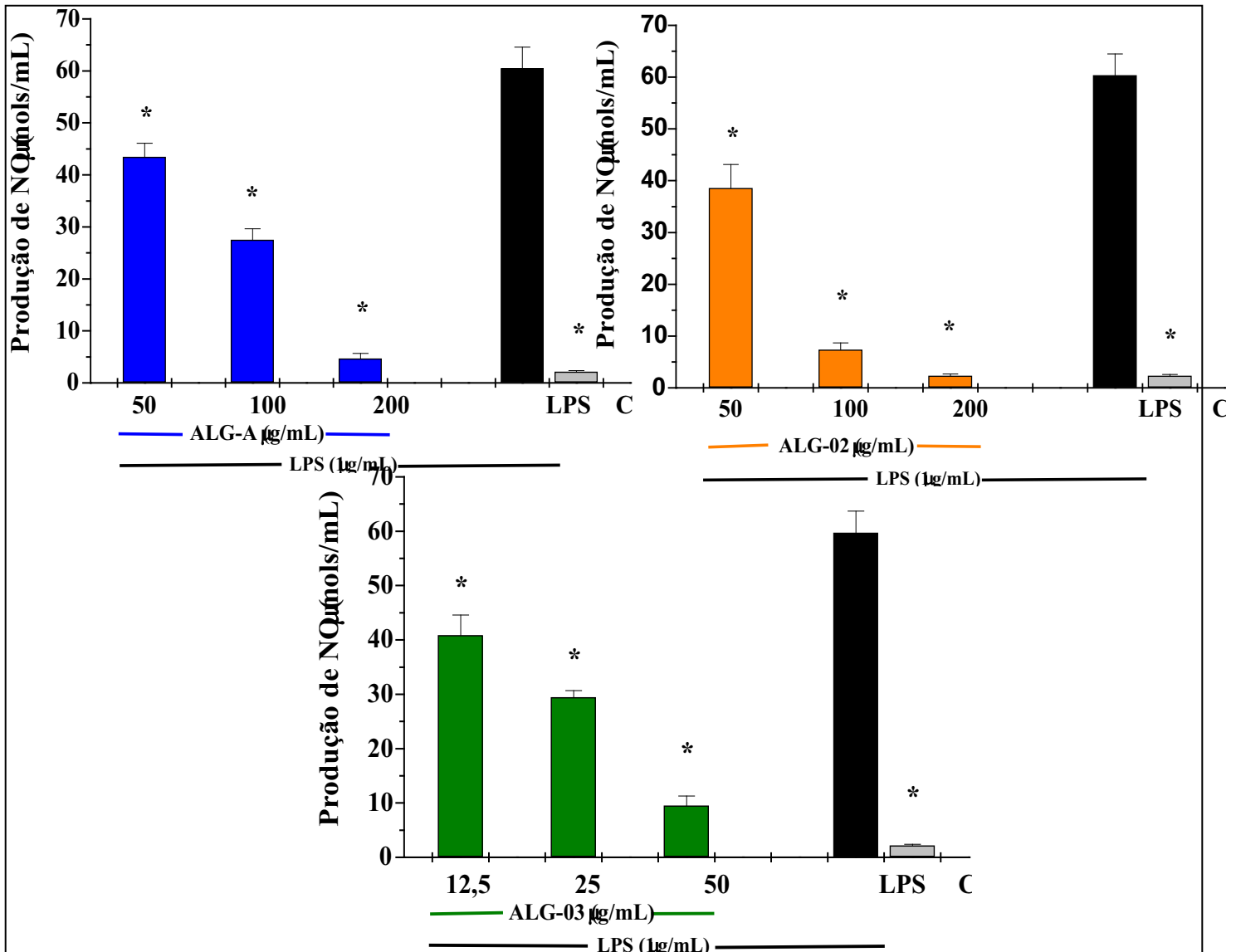


Figura 9. Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição da produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Solução de LPS foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo (CN), foram utilizadas apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * p<0,01 quando comparado ao controle positivo (LPS).

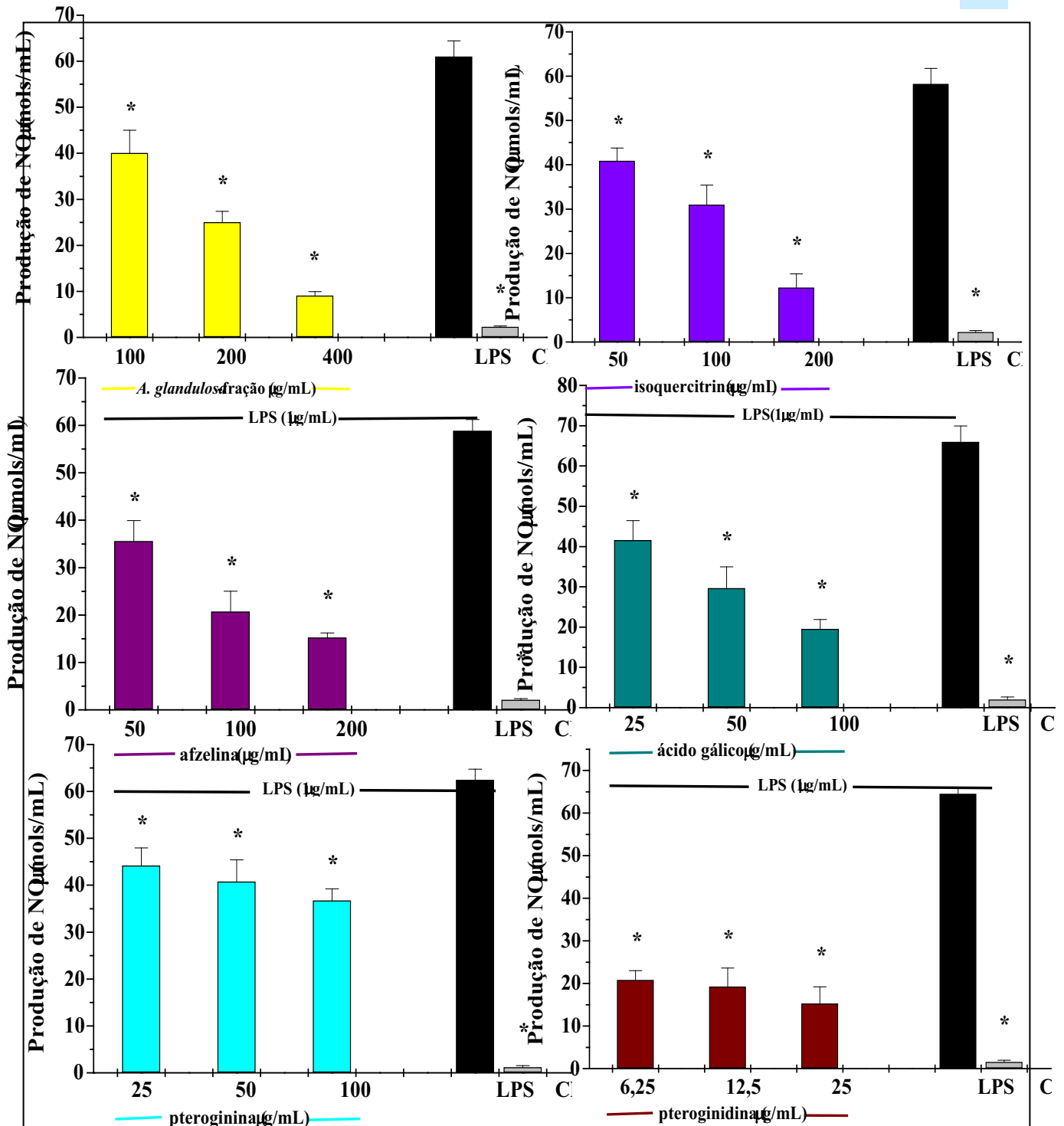


Figura 10. Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Solução de LPS foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo (CN), foram utilizadas apenas células em meio de cultura (RPMI-1640-C). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo (LPS).

Tabela 3. Porcentagem de inibição da produção de NO em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos.

Extratos/fração/subst.pura (µg/mL)	INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO (%)							
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	-	-	-	28,80±8,48	56,25±6,09	95,62±1,97	-	-
<i>ALG-02</i>	-	-	-	37,40±8,69	91,27±2,51	100,00±0,83	-	-
<i>ALG-03</i>	-	32,62±6,85	52,42±2,44	87,08±3,32	-	-	-	-
<i>fração</i>	-	-	-	-	35,22±11,00	61,23±3,56	88,36±1,64	-
<i>isoquercitrina</i>	-	-	-	30,77±6,15	48,95±5,48	81,85±5,82	-	-
<i>afzelina</i>	-	-	-	40,65±9,75	67,14±7,92	76,82±2,02	-	-
<i>ácido gálico</i>	-	-	37,78±9,78	56,59±9,17	72,38±5,52	-	-	-
<i>pteroginina</i>	-	-	29,65±7,69	35,27±8,74	42,03±4,10	-	-	-
<i>pteroginidina</i>	69,46±3,18	71,98±6,52	78,18±6,04	-	-	-	-	-

Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

5.3. Determinação da produção/inibição das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12

As preparações obtidas a partir dos extratos dos fungos endofíticos e também da fração acetato de etila e dos compostos isolados da planta *A. glandulosa* não induziram a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 em todas as concentrações testadas. Os valores de produção obtidos são semelhantes aos valores dos controles negativos das reações e estão demonstrados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7.

Contudo, essas mesmas preparações inibiram a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 em macrófagos ativados por LPS de maneira dose-dependente (Figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18). As porcentagens de inibição dessas citocinas foram calculadas e os resultados encontrados estão descritos nas Tabelas 8, 9, 10 e 11.

Houve uma forte inibição da produção de TNF- α em todas as preparações testadas, sendo que os três extratos de fungos endofíticos ALG-A, ALG-02 e ALG-03 apresentaram excelentes resultados. As ações dos compostos puros pteroginina e isoquercitrina também merecem destaque. Além disso, todas as preparações inibiram a produção de IL-1 β e IL-6, sendo que o extrato de fungo endofítico ALG-02, a fração acetato de etila de *A. glandulosa* e a pteroginina mostraram os melhores resultados na inibição da IL-1 β . O extrato de fungo endofítico ALG-02 também apresentou o melhor resultado na inibição da IL-6. De modo geral, nota-se que as taxas de inibição da IL-6, apesar de altas, foram inferiores às taxas de inibição obtidas durante os ensaios feitos com as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-12. Com relação à IL-12, houve novamente uma forte inibição desta citocina por todos os compostos testados, destacando-se especialmente os extratos de fungo endofítico ALG-02 e ALG-03, a fração acetato de etila de *A. glandulosa* e as substâncias puras afzelina, isoquercitrina, pteroginidina e ácido gálico.

Tabela 4. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos na produção de TNF- α em macrófagos não estimulados por LPS.

Compostos	RPMI	PRODUÇÃO DE TNF- α (pg/mL)							
		6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	20,42 \pm 5,64	-	-	-	19,54 \pm 1,55	20,35 \pm 1,80	22,55 \pm 4,29	-	-
<i>ALG-02</i>	19,09 \pm 2,76	-	-	-	19,16 \pm 3,66	20,24 \pm 1,47	19,174 \pm 3,46	-	-
<i>ALG-03</i>	17,80 \pm 3,77	-	17,93 \pm 1,33	19,86 \pm 1,31	20,94 \pm 2,91	-	-	-	-
<i>fração</i>	17,17 \pm 1,84	-	-	-	-	17,11 \pm 1,47	19,44 \pm 1,74	19,54 \pm 2,74	-
<i>isoquercitrina</i>	18,08 \pm 1,75	-	-	-	16,76 \pm 2,53	20,34 \pm 3,89	18,49 \pm 3,22	-	-
<i>afzelina</i>	17,95 \pm 3,17	-	-	-	17,29 \pm 3,13	18,07 \pm 3,71	20,13 \pm 2,88	-	-
<i>ácido gálico</i>	18,40 \pm 5,50	-	-	17,27 \pm 4,84	17,86 \pm 3,53	19,50 \pm 4,53	-	-	-
<i>pteroginina</i>	18,26 \pm 5,73	-	-	18,18 \pm 3,70	18,79 \pm 5,01	19,74 \pm 3,48	-	-	-
<i>pteroginidina</i>	17,61 \pm 3,27	19,51 \pm 4,07	20,14 \pm 2,96	20,28 \pm 3,86	-	-	-	-	-

Cada valor representa a média \pm desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata. Valores não estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (RPMI).

Tabela 5. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos na produção de IL-1 β em macrófagos não estimulados por LPS.

Compostos	RPMI	PRODUÇÃO DE IL-1 β (pg/mL)							
		6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	56,84 \pm 8,18	-	-	-	54,62 \pm 5,50	52,89 \pm 5,58	58,95 \pm 4,40	-	-
<i>ALG-02</i>	56,92 \pm 8,00	-	-	-	50,52 \pm 7,45	56,74 \pm 7,81	57,51 \pm 6,61	-	-
<i>ALG-03</i>	54,80 \pm 7,79	-	51,48 \pm 2,40	54,02 \pm 6,09	54,73 \pm 6,08	-	-	-	-
<i>fração</i>	57,83 \pm 5,64	-	-	-	-	56,22 \pm 5,99	51,29 \pm 7,19	61,04 \pm 3,45	-
<i>isoquercetrina</i>	57,57 \pm 7,10	-	-	-	55,95 \pm 6,07	54,10 \pm 7,18	59,09 \pm 6,07	-	-
<i>afzelina</i>	56,11 \pm 4,70	-	-	-	53,17 \pm 4,15	52,35 \pm 4,61	55,93 \pm 5,35	-	-
<i>ácido gálico</i>	61,56 \pm 4,11	-	-	56,15 \pm 7,04	60,79 \pm 5,92	62,97 \pm 10,09	-	-	-
<i>pteroginina</i>	54,39 \pm 4,58	-	-	51,48 \pm 6,55	48,77 \pm 4,91	55,98 \pm 2,31	-	-	-
<i>pteroginidina</i>	57,04 \pm 2,86	48,15 \pm 2,59	52,11 \pm 5,23	55,98 \pm 8,37	-	-	-	-	-

Cada valor representa a média \pm desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

Tabela 6. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos na produção de IL-6 em macrófagos não estimulados por LPS.

Compostos	RPMI	PRODUÇÃO DE IL-6 (pg/mL)							
		6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	44,24±8,55	-	-	-	49,16±8,62	46,75±4,94	45,70±11,75	-	-
<i>ALG-02</i>	42,87±8,93	-	-	-	40,20±7,24	43,04±4,96	39,24±3,32	-	-
<i>ALG-03</i>	40,71±9,06	-	43,01±7,46	45,80±8,46	45,85±13,18	-	-	-	-
<i>fração</i>	45,25±9,68	-	-	-	-	46,074±9,04	43,70±6,25	50,27±7,89	-
<i>isoquercitrina</i>	31,39±8,02	-	-	-	34,41±4,61	34,86±11,11	37,73±6,72	-	-
<i>afzelina</i>	48,40±9,75	-	-	-	46,06±6,93	49,35±7,21	51,40±9,78	-	-
<i>ácido gálico</i>	41,76±4,80	-	-	41,93±8,14	44,72±8,19	44,52±8,31	-	-	-
<i>pteroginina</i>	44,35±9,97	-	-	41,06±9,15	43,10±10,87	45,15±3,36	-	-	-
<i>pteroginidina</i>	43,89±8,72	42,11±9,49	42,15±4,22	46,95±7,90	-	-	-	-	-

Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

Valores não estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (RPMI).

Tabela 7. Efeitos das preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos na produção de IL-12 em macrófagos não estimulados por LPS.

Compostos	RPMI	PRODUÇÃO DE IL-12 (pg/mL)							
		6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	56,90±6,95	-	-	-	57,29±6,90	57,23±5,07	57,74±3,74	-	-
<i>ALG-02</i>	61,14±5,67	-	-	-	61,04±7,88	61,47±2,75	62,98±6,63	-	-
<i>ALG-03</i>	51,78±6,41	-	47,81±5,97	51,63±7,08	52,62±3,77	-	-	-	-
<i>fração</i>	57,48±6,28	-	-	-	-	53,25± 6,08	56,62±7,07	58,34±5,19	-
<i>isoquercitrina</i>	52,21±3,82	-	-	-	48,72±8,02	50,27±4,22	53,56±4,00	-	-
<i>afzelina</i>	59,89±3,76	-	-	-	57,50±7,85	60,84±6,08	60,97±2,44	-	-
<i>ácido gálico</i>	50,82±4,34	-	-	52,95±5,74	52,98±4,43	52,87±6,60	-	-	-
<i>pteroginina</i>	64,82±7,04	-	-	65,33±7,54	65,41±4,17	65,74±5,51	-	-	-
<i>pteroginidina</i>	59,42±6,10	58,36±3,69	61,19±2,36	61,74±4,95	-	-	-	-	-

Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata. Valores não estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (RPMI).

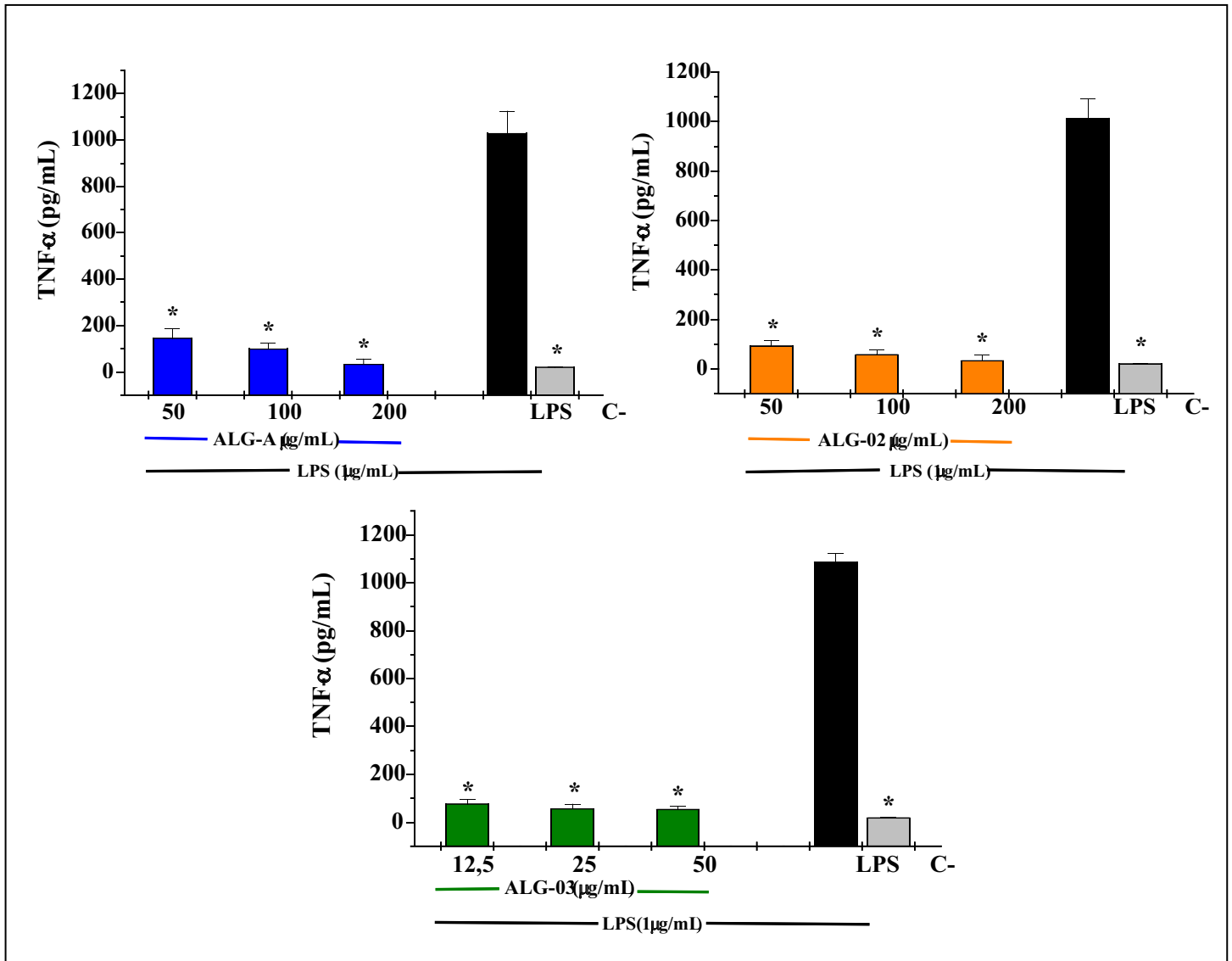


Figura 11. Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição da produção de TNF-α em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1 μg/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C-). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * p<0,01 quando comparados ao controle positivo (LPS).

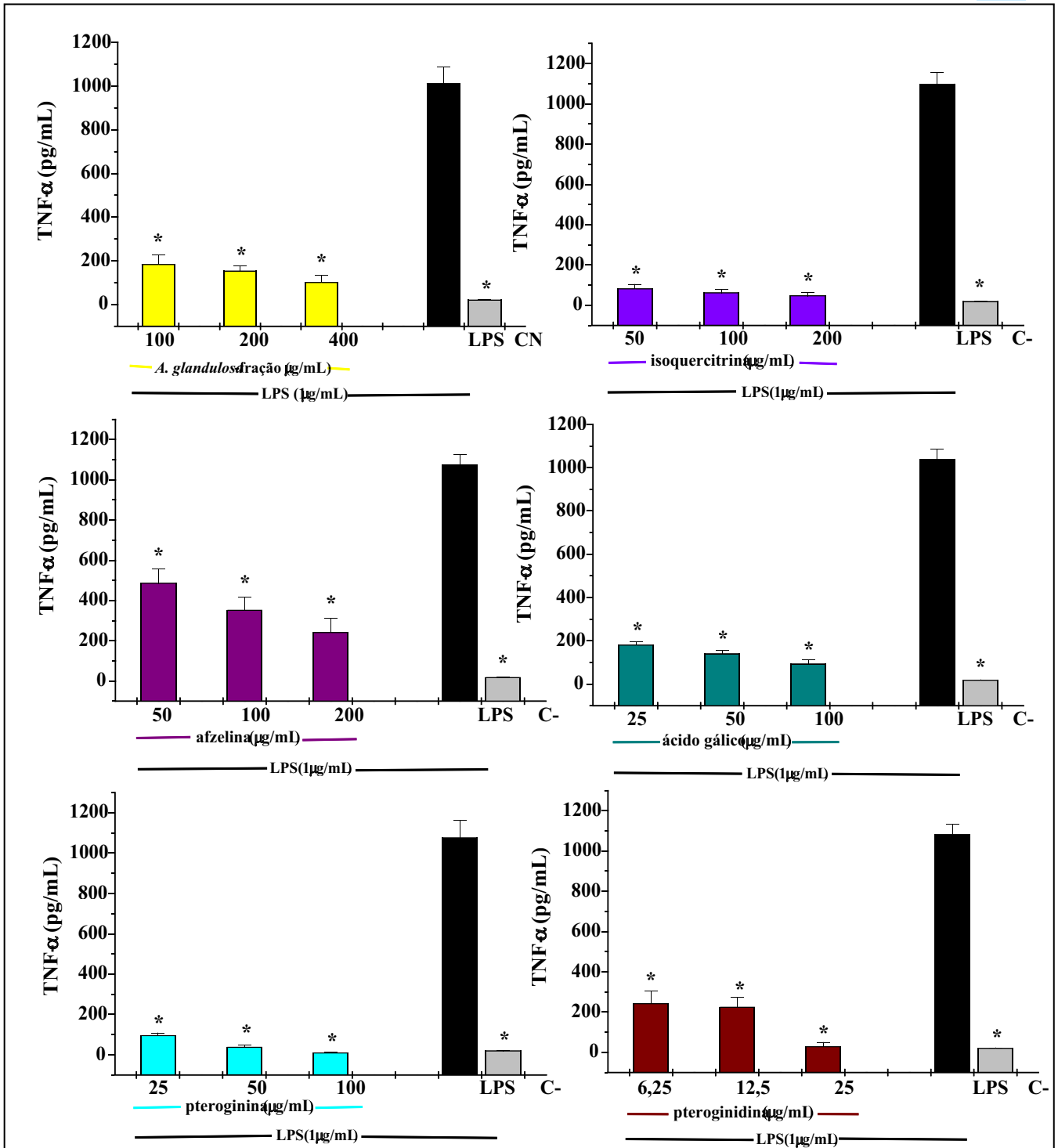


Figura 12. Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1 μ g/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C-). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * $p < 0,01$ quando comparados ao controle positivo (LPS).

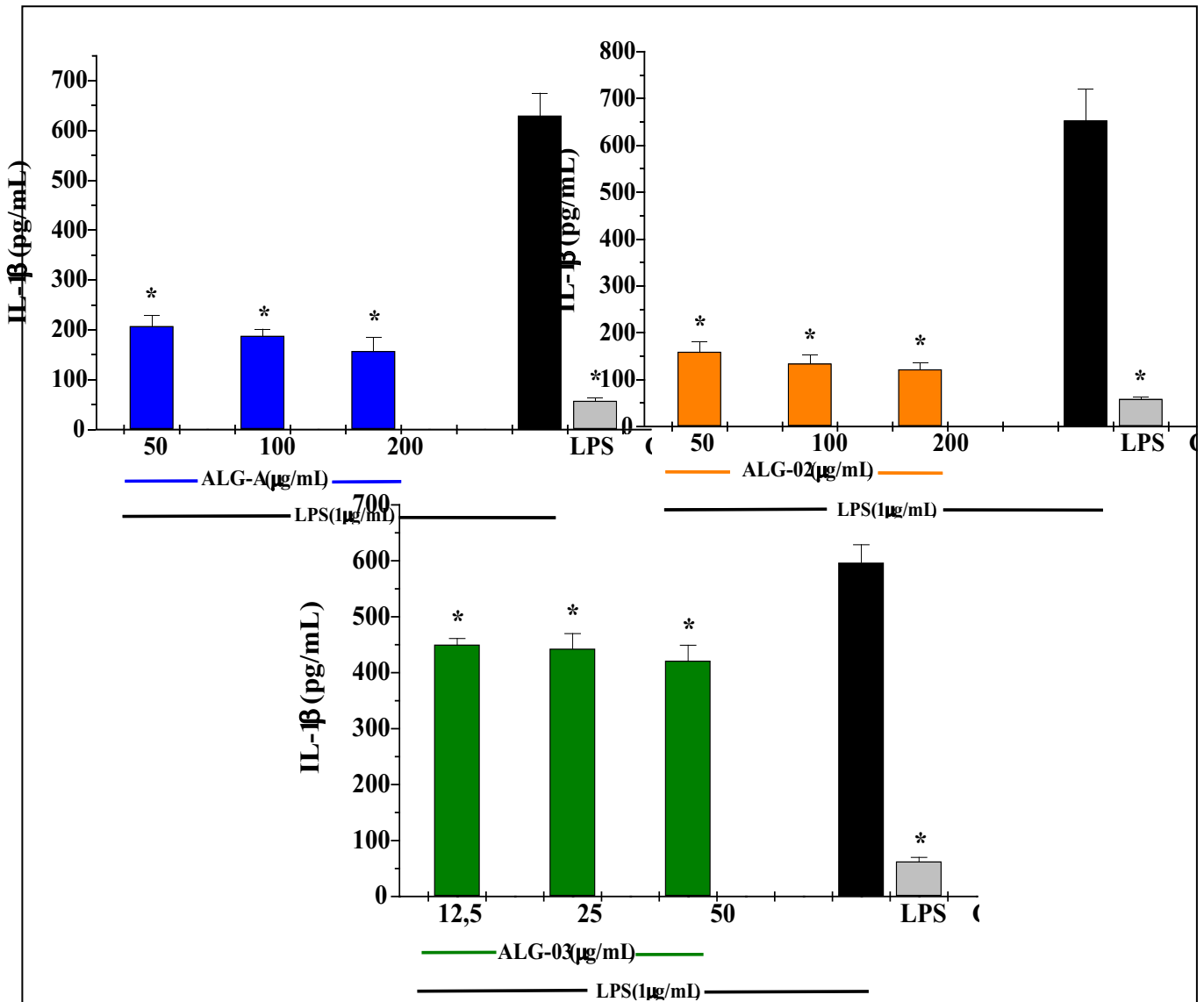


Figura 13. Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição da produção de IL-1β em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1 μg/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C-). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * p<0,01 quando comparados ao controle positivo (LPS).

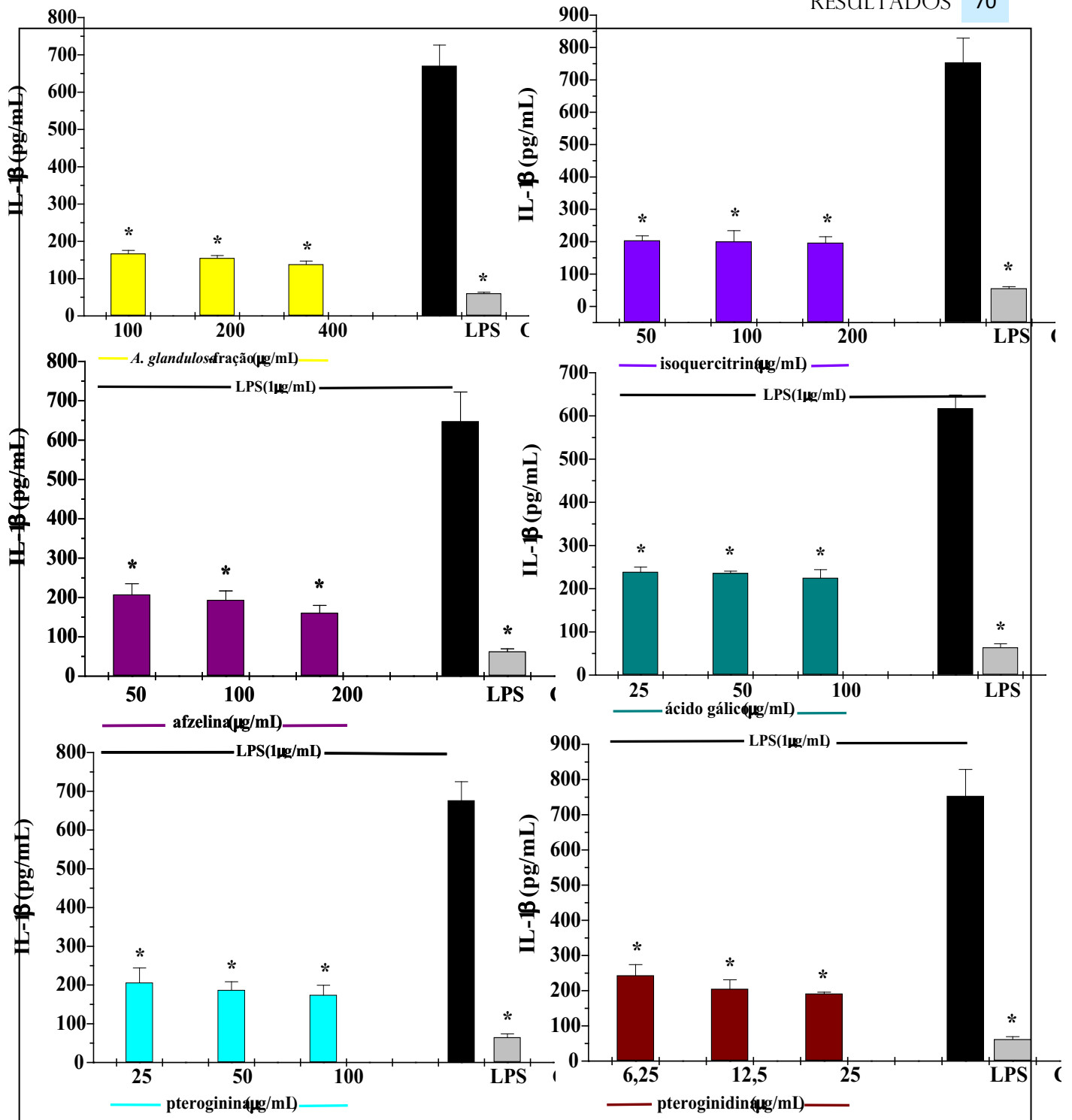


Figura 14. Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de IL-1β em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1 μg/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C-). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * p<0,01 quando comparados ao controle positivo (LPS).

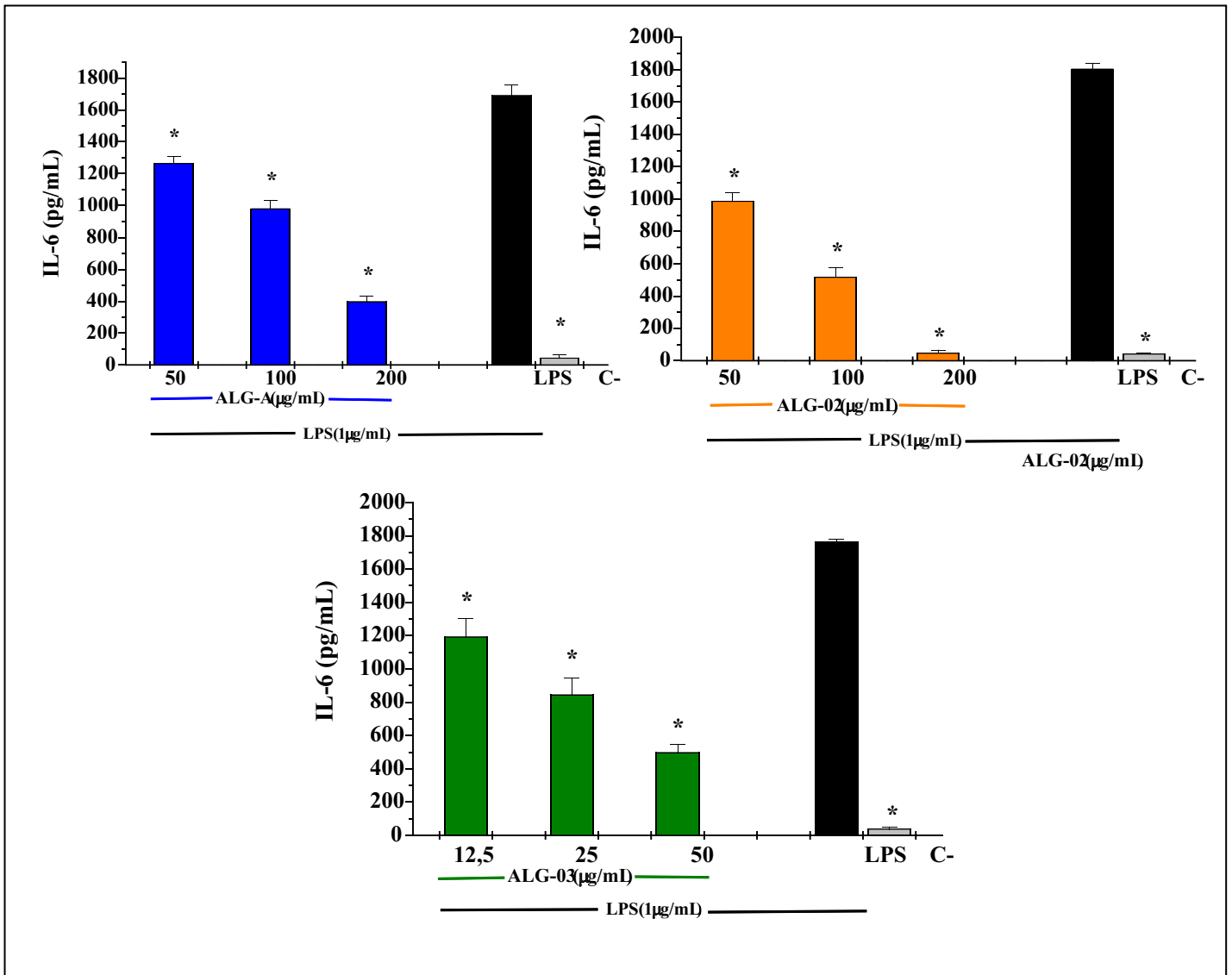


Figura 15. Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição produção de IL-6 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1µg/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C-). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * p<0,01 quando comparados ao controle positivo (LPS).

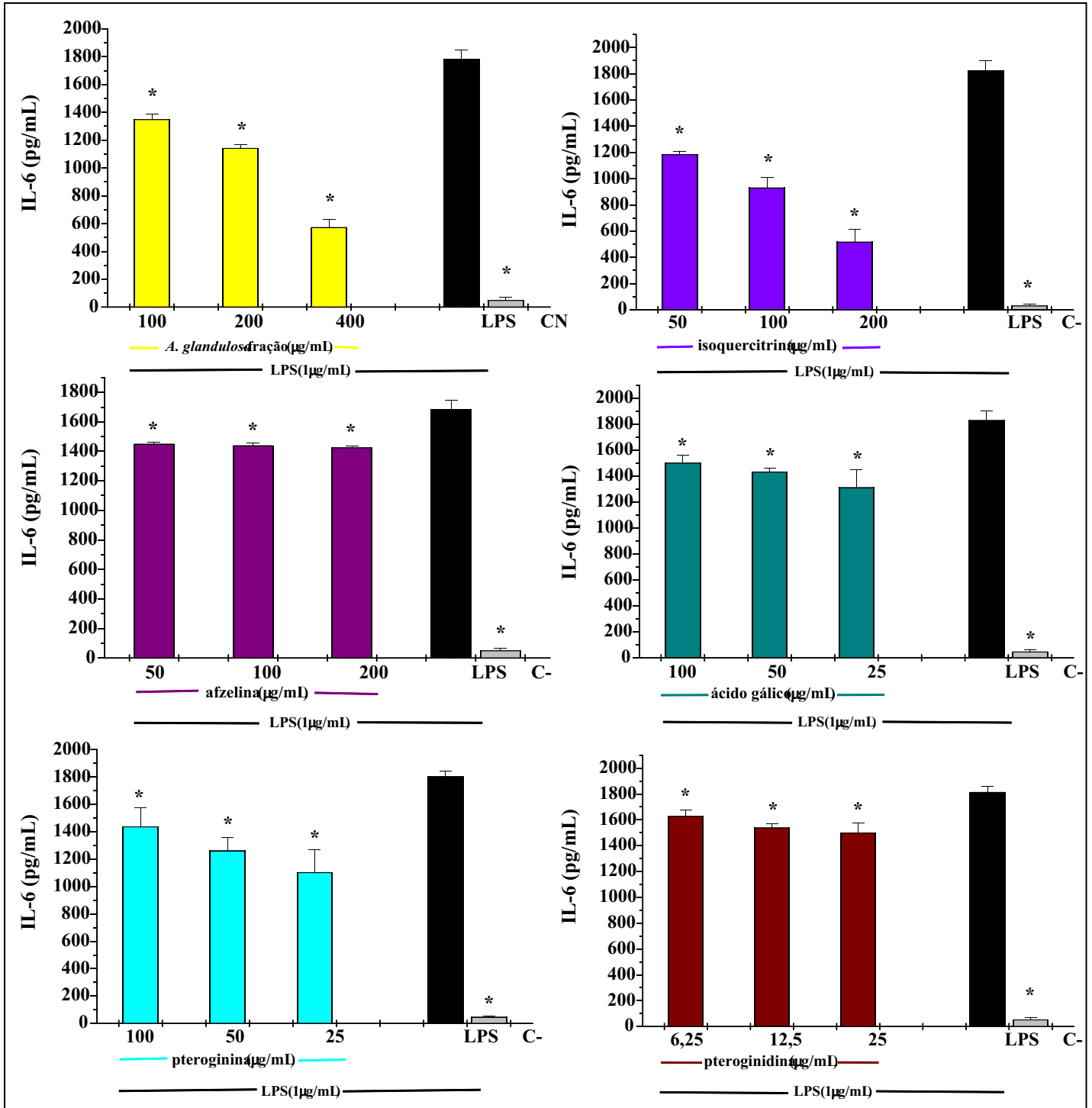


Figura 16. Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de IL-6 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1 µg/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C-). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * p<0,01 quando comparados ao controle positivo (LPS).

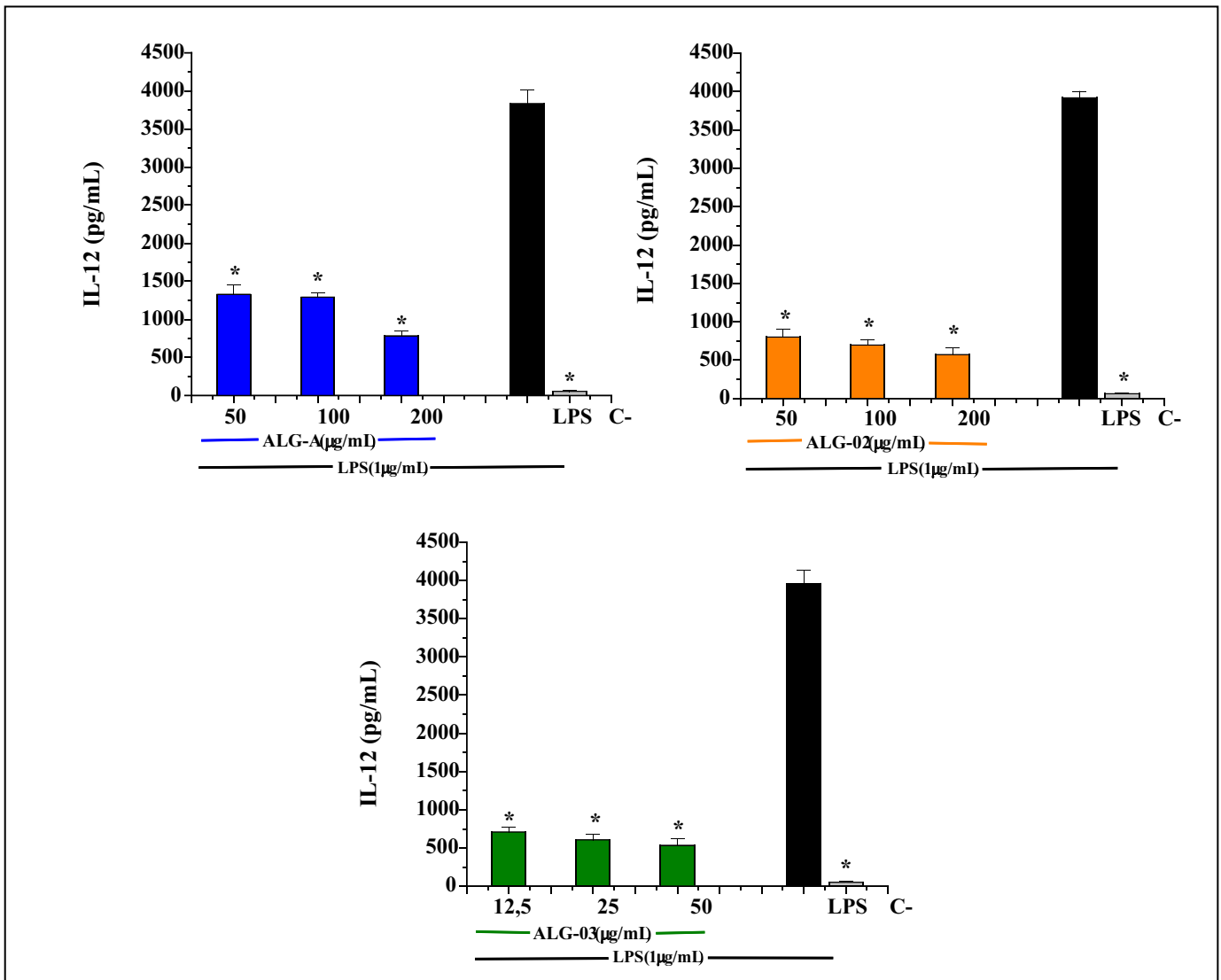


Figura 17. Efeitos das diferentes concentrações de ALG-A, ALG-02 e ALG-03 na inibição da produção de IL-12 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1 µg/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C-). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * p<0,01 quando comparados ao controle positivo (LPS).

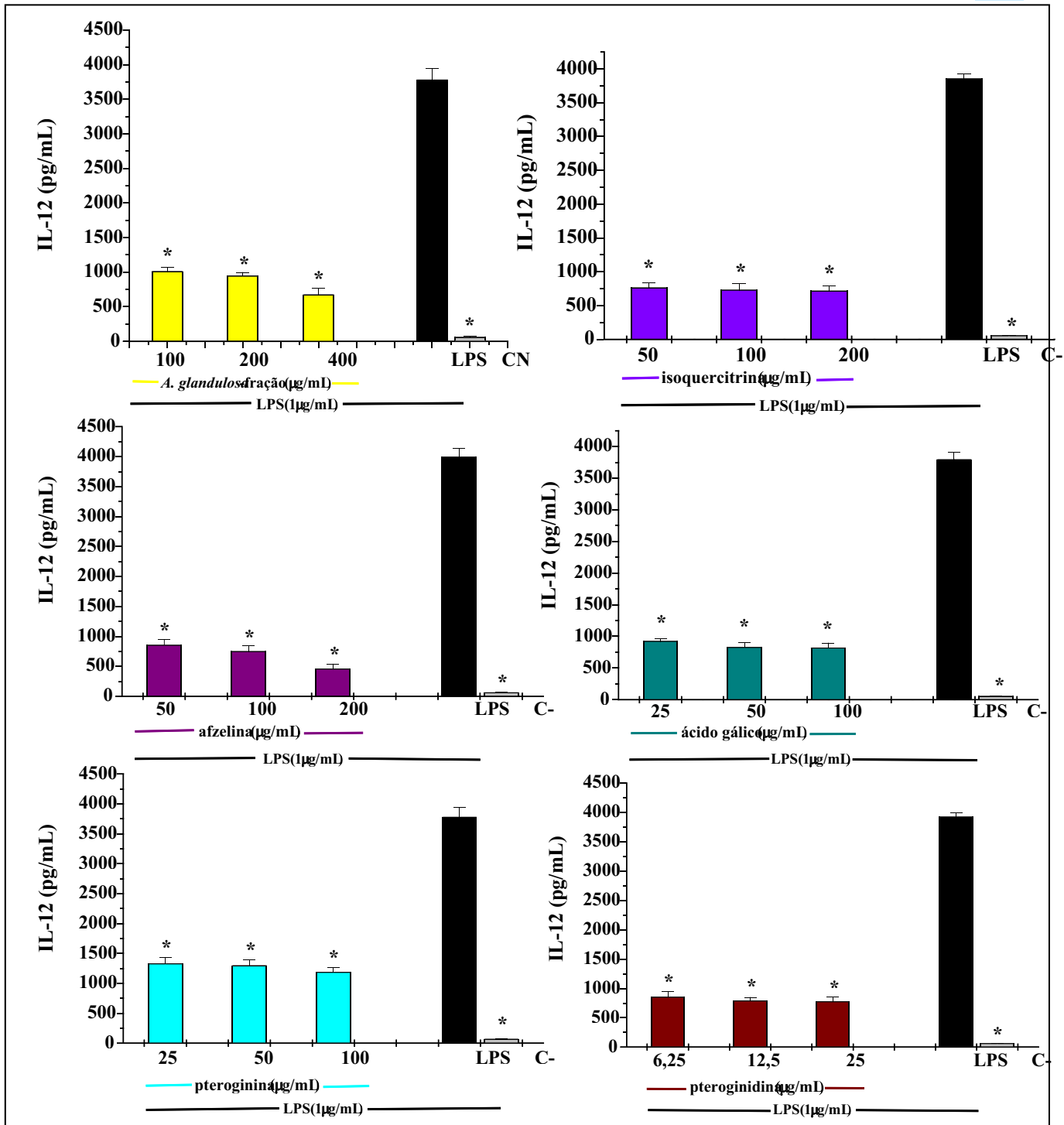


Figura 18. Efeitos das diferentes concentrações da fração acetato de etila e dos compostos isolados de *A. glandulosa* (isoquercitrina, afzelina, ácido gálico, pteroginina e pteroginidina) na inibição da produção de IL-12 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados por LPS. Sobrenadantes coletados de macrófagos incubados somente na presença de solução de LPS (1µg/mL) ou de meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizados, respectivamente, como controle positivo (LPS) e negativo (C-). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * p<0,01 quando comparados ao controle positivo (LPS).

Tabela 8. Porcentagem de inibição da produção de TNF- α em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos.

Extratos/fração/subst.pura ($\mu\text{g/mL}$)	INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF- α (%)							
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	-	-	-	87,64 \pm 4,49	91,94 \pm 3,71	98,56 \pm 2,81	-	
<i>ALG-02</i>	-	-	-	92,70 \pm 2,16	96,23 \pm 1,94	98,71 \pm 2,39	-	
<i>ALG-03</i>	-	94,60 \pm 1,76	96,41 \pm 2,08	96,67 \pm 1,48	-	-	-	
<i>fração</i>	-	-	-	-	83,41 \pm 5,22	86,60 \pm 2,55	91,87 \pm 3,50	
<i>isoquercitrina</i>	-	-	-	94,11 \pm 2,15	95,95 \pm 1,57	97,29 \pm 1,56	-	
<i>afzelina</i>	-	-	-	55,46 \pm 7,56	68,28 \pm 6,27	79,02 \pm 5,92	-	
<i>ácido gálico</i>	-	-	84,01 \pm 2,09	88,01 \pm 1,60	92,58 \pm 2,14	-	-	
<i>pteroginina</i>	-	-	92,72 \pm 2,20	98,28 \pm 1,38	100,98 \pm 0,40	-	-	
<i>pteroginidina</i>	78,84 \pm 6,60	80,71 \pm 5,06	99,18 \pm 2,00	-	-	-	-	

Cada valor representa a média \pm desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

Tabela 9. Porcentagem de inibição da produção de IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos.

Extratos/fração/subst.pura ($\mu\text{g/mL}$)	INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-1 β (%)							
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	-	-	-	73,59 \pm 4,05	76,96 \pm 3,60	82,29 \pm 5,99	-	-
<i>ALG-02</i>	-	-	-	83,19 \pm 2,92	87,44 \pm 2,59	89,39 \pm 2,13	-	-
<i>ALG-03</i>	-	27,29 \pm 2,94	28,45 \pm 8,48	32,62 \pm 6,25	-	-	-	-
<i>fração</i>	-	-	-	-	82,35 \pm 2,36	84,45 \pm 1,31	87,09 \pm 2,09	-
<i>isoquercetrina</i>	-	-	-	78,58 \pm 3,44	78,86 \pm 6,39	79,58 \pm 3,98	-	-
<i>afzelina</i>	-	-	-	75,30 \pm 4,66	77,27 \pm 5,33	83,32 \pm 2,60	-	-
<i>ácido gálico</i>	-	-	68,37 \pm 1,55	68,81 \pm 2,29	70,85 \pm 3,09	-	-	-
<i>pteroginina</i>	-	-	76,85 \pm 7,80	80,14 \pm 1,58	81,89 \pm 5,76	-	-	-
<i>pteroginidina</i>	73,35 \pm 6,00	78,98 \pm 4,78	81,12 \pm 1,77	-	-	-	-	-

Cada valor representa a média \pm desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

Tabela 10. Porcentagem de inibição da produção de IL-6 em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos.

Extratos/fração/subst.pura (µg/mL)	INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-6 (%)							
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	-	-	-	25,75±4,09	42,97±4,28	78,46±2,23	-	-
<i>ALG-02</i>	-	-	-	46,37±3,77	73,03±3,78	99,74±1,22	-	-
<i>ALG-03</i>	-	33,12±5,83	53,35±5,42	73,46±2,75	-	-	-	-
<i>fração</i>	-	-	-	-	24,92±4,35	36,88±3,28	69,76±2,88	-
<i>isoquercitrina</i>	-	-	-	35,55±3,83	49,80±5,37	72,79±5,12	-	-
<i>afzelina</i>	-	-	-	14,30±3,58	14,99±4,13	15,81±2,63	-	-
<i>ácido gálico</i>	-	-	18,36±4,38	22,11±4,91	28,96±7,52	-	-	-
<i>pteroginina</i>	-	-	20,90±7,11	30,86±5,40	39,93±9,27	-	-	-
<i>pteroginidina</i>	10,56±2,27	15,63±2,12	17,89±2,70	-	-	-	-	-

Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

Tabela 11. Porcentagem de inibição da produção de IL-12 em macrófagos estimulados por LPS pelas preparações obtidas a partir da planta *A. glandulosa* e de fungos endofíticos.

Extratos/fração/subst.pura ($\mu\text{g/mL}$)	INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-12 (%)							
	6,25	12,5	25	50	100	200	400	
<i>ALG-A</i>	-	-	-	66,25 \pm 2,72	67,14 \pm 3,04	80,66 \pm 2,46	-	-
<i>ALG-02</i>	-	-	-	80,85 \pm 2,33	83,51 \pm 2,10	86,79 \pm 2,29	-	-
<i>ALG-03</i>	-	83,21 \pm 1,04	85,78 \pm 2,19	87,70 \pm 1,77	-	-	-	-
<i>fração</i>	-	-	-	-	74,35 \pm 2,85	76,11 \pm 1,95	83,50 \pm 2,70	-
<i>isoquercitrina</i>	-	-	-	81,41 \pm 2,40	82,25 \pm 2,50	82,63 \pm 1,78	-	-
<i>afzelina</i>	-	-	-	79,86 \pm 2,20	82,56 \pm 2,23	89,90 \pm 2,50	-	-
<i>ácido gálico</i>	-	-	76,74 \pm 1,179	79,30 \pm 1,77	79,56 \pm 2,01	-	-	-
<i>pteroginina</i>	-	-	66,01 \pm 2,63	66,89 \pm 2,44	69,81 \pm 3,40	-	-	-
<i>pteroginidina</i>	79,53 \pm 2,51	81,17 \pm 1,46	81,50 \pm 2,28	-	-	-	-	-

Cada valor representa a média \pm desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

Uma vez que todos os compostos testados inibiram a produção de NO e citocinas, eles foram classificados por ordem de potência em cada ensaio. Desse modo, foi calculado o potencial antiinflamatório de cada composto através da média dos valores de porcentagem de inibição nos ensaios de NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12.

Na Tabela 12 é possível observar que o extrato de fungo endofítico ALG-02, apresentou excelentes resultados em todos os testes, sendo a amostra mais potente na inibição do NO, IL-1 β e IL-6 e o terceiro mais potente na inibição de TNF- α e IL-12. O extrato de fungo endofítico ALG-03 também possui grande potencial para inibir a IL-12, o TNF- α e a IL-6. Além disso, a fração acetato de etila de *A. glandulosa* exibiu bons resultados nos ensaios de inibição de NO e IL-1 β . O alcalóide pteroginina inibiu intensamente o TNF- α e a IL-1 β , enquanto que a pteroginidina inibiu fortemente o NO. Os flavonóides isoquercitrina e afzelina exibiram bons resultados, respectivamente, nos ensaios de IL-6 e IL-12.

Tabela 12. Ordem de potencial antiinflamatório de cada composto avaliado através da média dos valores de porcentagem de inibição nos ensaios de NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12.

ORDEM DE POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO					
	NO	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-12
1°	ALG-02	pteroginina	ALG-02	ALG-02	ALG-03
2°	pteroginidina	ALG-03	fração	ALG-03	afzelina
3°	fração	ALG-02	pteroginina	isoquercitrina	ALG-02
4°	afzelina	isoquercitrina	isoquercitrina	ALG-A	isoquercitrina
5°	ALG-A	ALG-A	afzelina	fração	pteroginidina
6°	ALG-03	ácido gálico	pteroginidina	pteroginina	ácido gálico
7°	ácido gálico	fração	ALG-A	ácido gálico	fração
8°	isoquercitrina	pteroginidina	ácido gálico	afzelina	ALG-A
9°	pteroginina	afzelina	ALG-03	pteroginidina	pteroginina

5.4. Determinação da atividade citotóxica dos compostos nas linhagens tumorais murinas LM2 e LP07

A avaliação da atividade citotóxica das preparações obtidas a partir dos extratos dos fungos endofíticos e também da fração acetato de etila e dos compostos isolados da planta *A. glandulosa* sobre o crescimento celular foi realizada utilizando-se duas linhagens tumorais murinas: linhagem LM2 (adenocarcinoma de mama) e a linhagem LP07 (adenocarcinoma de pulmão).

Comparando-se os valores de IC₅₀ dos compostos testados com o valor de IC₅₀ do controle (doxorubicina), observou-se uma potente atividade citotóxica do ácido gálico (IC₅₀=5,48 μ g/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-03 (IC₅₀=9,37 μ g/mL) e

da pteroginidina ($IC_{50}=18,66\mu\text{g/mL}$) nas células LM2, com valores de IC_{50} próximos ao valor de IC_{50} da doxorrubicina ($IC_{50}=0,83\mu\text{g/mL}$). Com relação às células LP07, a afzelina ($IC_{50}=2,31\mu\text{g/mL}$), o ácido gálico ($IC_{50}=3,35\mu\text{g/mL}$), o extrato de fungo endofítico ALG-02 ($IC_{50}=7,87\mu\text{g/mL}$) e a fração acetato de etila de *A. glandulosa* ($IC_{50}=10,15\mu\text{g/mL}$) também possuem alta atividade citotóxica com valores de IC_{50} próximos ao da doxorrubicina ($IC_{50}=0,52\mu\text{g/mL}$) (Tabela 13).

Tabela 13. Determinação da atividade citotóxica de compostos isolados através da técnica de MTT em células da linhagem LM2 (adenocarcinoma de mama) e LP07 (adenocarcinoma de pulmão).

COMPOSTOS TESTADOS	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	LM2	LP07
fração acetato de etila - <i>A. glandulosa</i>	31,69±3,31	10,15±0,61
ALG-A	174,21±3,09	45,35±0,01
ALG-02	67,59±0,07	7,87±1,12
ALG-03	9,37±1,75	34,38±0,03
isoquercitrina	58,27±1,71	105,81±2,09
afzelina	239,88±4,43	2,31±0,47
ácido gálico	5,48±0,34	3,35±0,15
pteroginina	101,91±0,08	167,8±4,45
pteroginidina	18,66±0,13	22,48±1,43
doxorrubicina (controle)	0,83±0,01	0,52±0,01

Os valores de 50% da concentração inibitória para o crescimento celular (IC_{50}) foram expressos como a concentração resultante em 50% da redução do crescimento das células tumorais e foram calculadas através de regressão linear utilizando o programa Origin 5.0.

5.5. Avaliação da angiogênese

Foram estudadas as diversas etapas da angiogênese, como a viabilidade celular, a proliferação, a apoptose, a invasão e a formação de estruturas tipo capilares utilizando culturas de células endoteliais (HUVEC). Para os estudos de angiogênese

foram escolhidos os seguintes compostos: a fração acetato de etila de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02 e os compostos puros afzelina e pteroginidina. Devido à relação entre NO e angiogênese, esses compostos foram escolhidos baseando-se nos excelentes resultados obtidos nos ensaios de inibição de NO (Figuras 9 e 10, Tabela 3).

5.5.1. Ensaios de viabilidade das células HUVEC

Para avaliar se a fração, o extrato ALG-02 e as substâncias puras afetavam a viabilidade das células HUVEC, a viabilidade celular foi estudada através do ensaio de MTT.

A partir dos resultados encontrados nos ensaios de citotoxicidade, foram definidas as concentrações ideais de cada composto como sendo a maior porcentagem de viabilidade após 24h de incubação (Figura 19). As concentrações ideais assim determinadas foram utilizadas em todos os ensaios de angiogênese (Tabela 14).

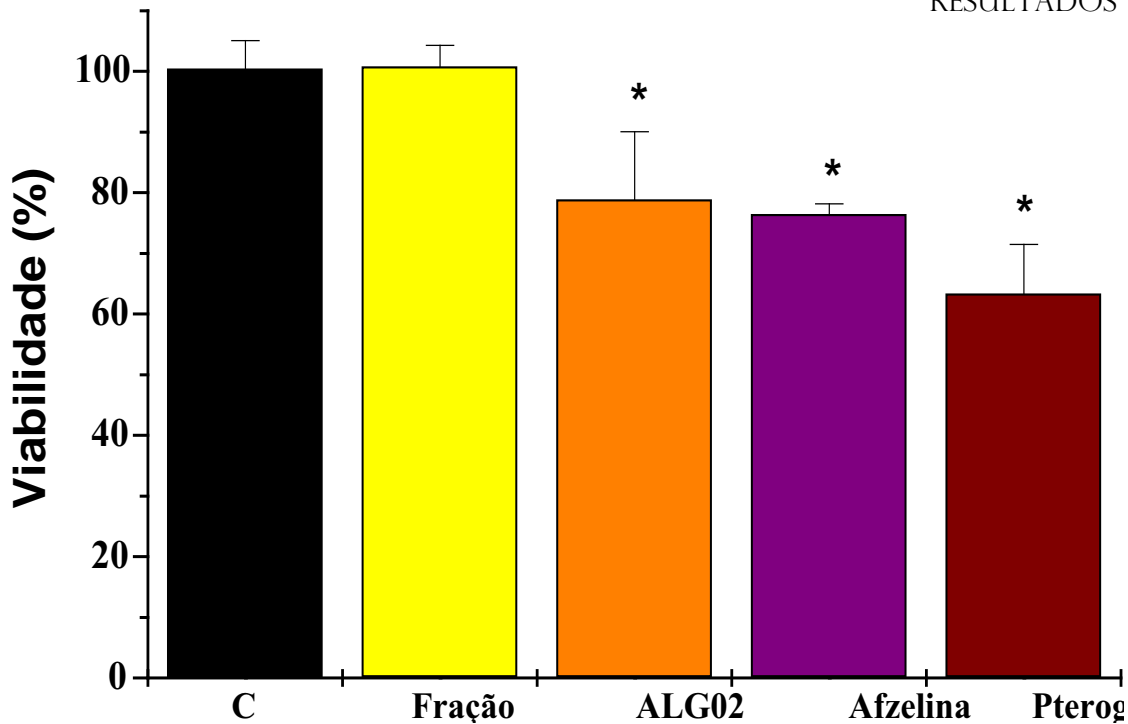


Figura 19. Efeitos da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) na viabilidade das células HUVEC avaliadas pela técnica de MTT. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células controle (C). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * $p < 0,01$ quando comparados ao controle (C).

Tabela 14. Concentrações dos compostos utilizados nos ensaios de angiogênese.

Composto	Concentrações utilizadas nos ensaios (µg/mL)
ALG-02 (extrato acetato de etila)	100
fração acetato de etila - <i>A. glandulosa</i>	50
afzelina	50
pteroginidina	1,56

Compostos diluídos em meio de cultura M199 com 2% de FBS e no máximo 0,1% de DMSO.

5.5.2. Ensaios de proliferação

Na avaliação da proliferação utilizando-se células HUVEC e o ensaio de BrdU foi observado um significativo decréscimo na porcentagem das células proliferativas com todos os compostos testados. Contudo, o alcalóide pteroginidina exibiu um excelente resultado, mostrando uma drástica redução da proliferação (Figura 20).

O análogo de pirimidina BrdU é incorporado ao DNA das células proliferantes substituindo a timidina. Essa etapa ocorre durante a fase S da mitose, marcando essas células. Na reação imunohistoquímica utilizando-se BrdU, as células consideradas positivas, ou seja marcadas pela BrdU, apresentam núcleos de coloração castanha. Nas fotomicrografias, pode-se notar a presença de muitas células marcadas no controle. Apesar de inibir a proliferação, a fração acetato de etila mostra um maior número de células marcadas em relação aos outros compostos. É importante ressaltar que a pteroginidina induziu um decréscimo tão intenso na proliferação, cerca de 8 vezes comparando-se ao controle, que praticamente não existem células marcadas quando as células HUVEC são incubadas com esse alcalóide (Figura 21).

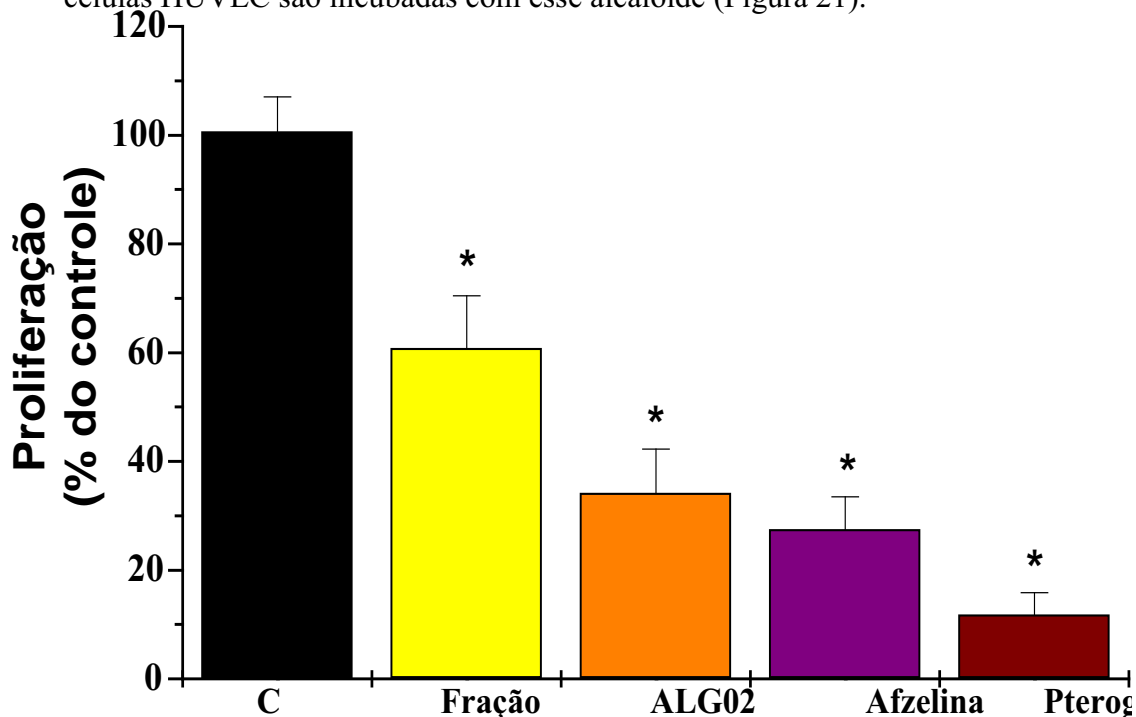


Figura 20. Efeitos da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) na proliferação das células HUVEC avaliadas pela técnica de BrdU. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células controle (C). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * $p < 0,01$ quando comparados ao controle (C).

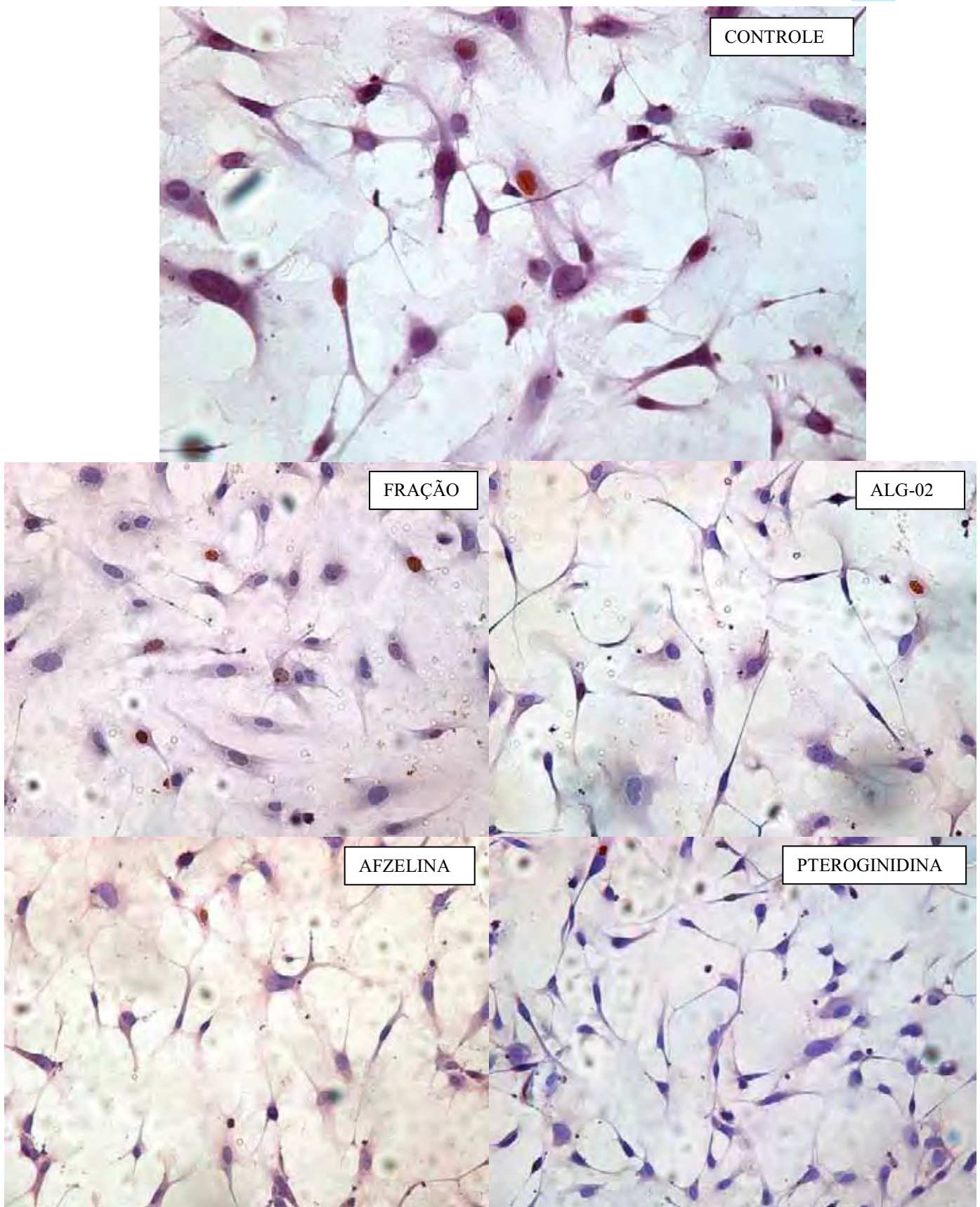


Figura 21: Fotomicrografias da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50 μ g/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100 μ g/mL), da afzelina (50 μ g/mL) e da pteroginidina (1,56 μ g/mL) obtidas através da técnica de BrdU. As células marcadas com BrDU apresentam núcleos de coloração castanha. Aumento de 200X.

5.5.3. Avaliação da apoptose através da técnica de TUNEL

No estudo da apoptose utilizando-se células HUVEC e o ensaio de TUNEL, a porcentagem de células apoptóticas em todas as culturas foi avaliada baseando-se na relação entre as células coradas com TUNEL e os núcleos corados com DAPI. Foi observado um forte aumento na porcentagem de células apoptóticas nas culturas tratadas com a fração acetato de etila de *A. glandulosa* e com o alcalóide pteroginidina (Figura 22). Quando comparou-se a fração e o alcalóide com as células controle, pôde-se notar que a fração foi capaz de induzir um aumento de aproximadamente 19 vezes na taxa de apoptose, enquanto que a elevação causada pela pteroginidina foi de 14 vezes.

Nas fotomicrografias tiradas em microscópio de fluorescência utilizando-se TUNEL e DAPI, pode ser observada a indução da apoptose nas células HUVEC tratadas com a fração acetato de etila de *A. glandulosa* (Figura 23) e nas células tratadas o alcalóide pteroginidina (Figura 24).

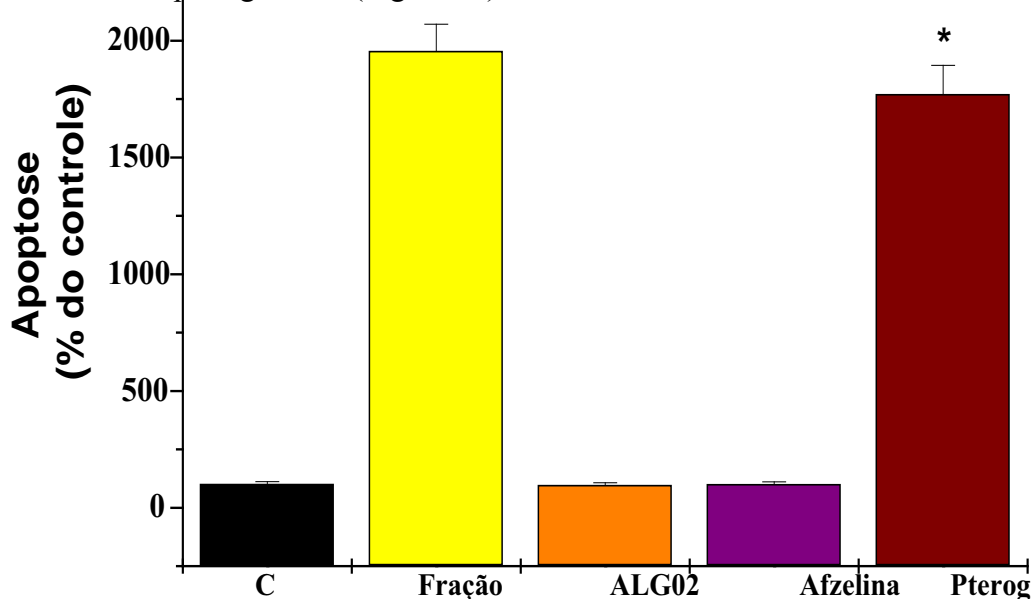


Figura 22. Efeitos da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) na apoptose das células HUVEC avaliadas pela técnica de TUNEL. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células controle (C). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * $p < 0,01$ quando comparados ao controle (C).

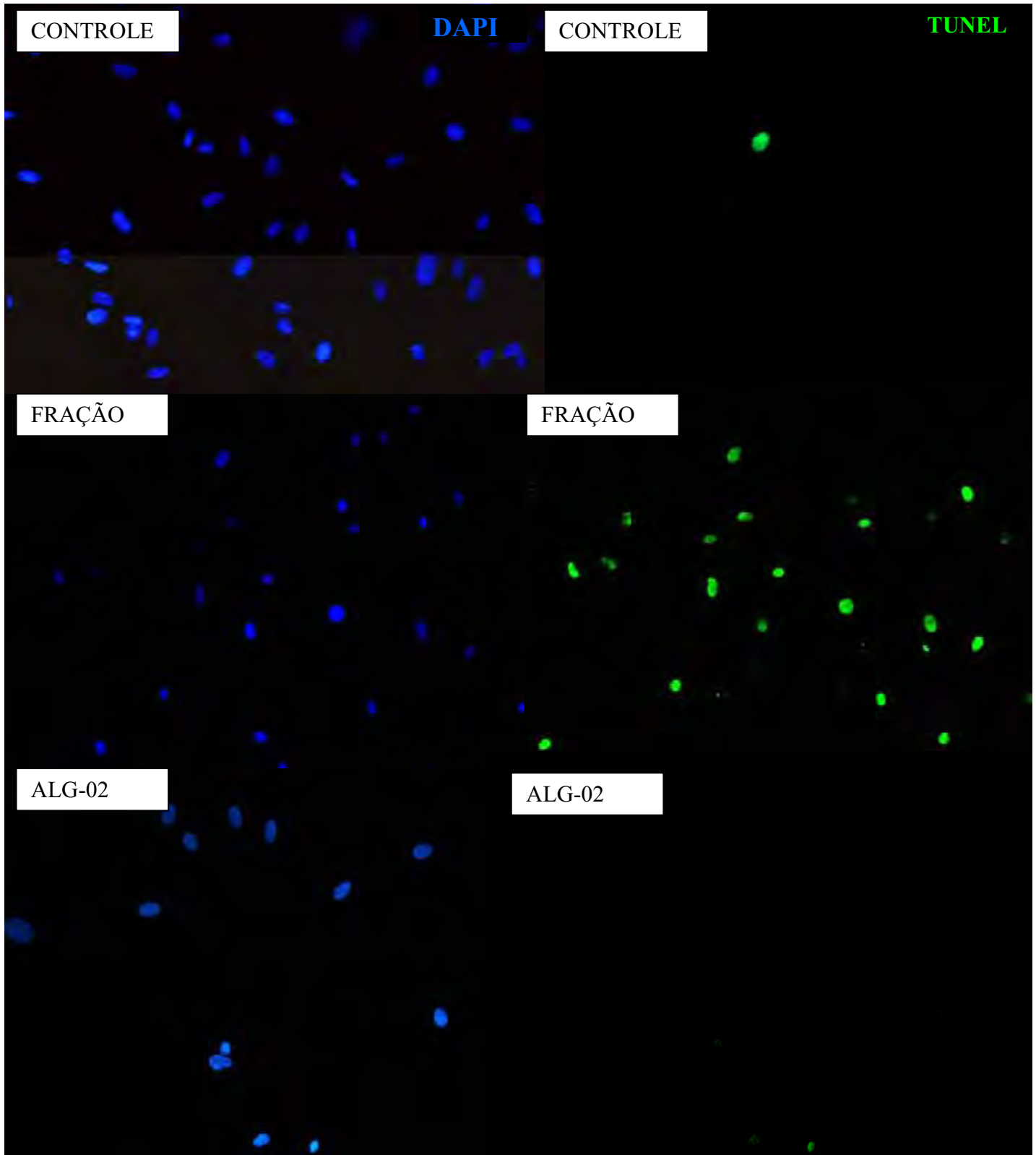


Figura 23. Fotomicrografias do controle (meio M199), da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL) e do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL) obtidas através da técnica de TUNEL em microscópio de fluorescência (aumento de 200X). As células foram tratadas com os compostos e fotomicrografias foram tiradas do mesmo campo com filtros diferentes. Células em azul (marcadas com DAPI) e em verde (marcadas com TUNEL). A indução da apoptose é indicada pela cor verde devido a incorporação de TUNEL. Nas células tratadas com a fração acetato de etila de *A. glandulosa* ocorreu um grande aumento na taxa de apoptose.

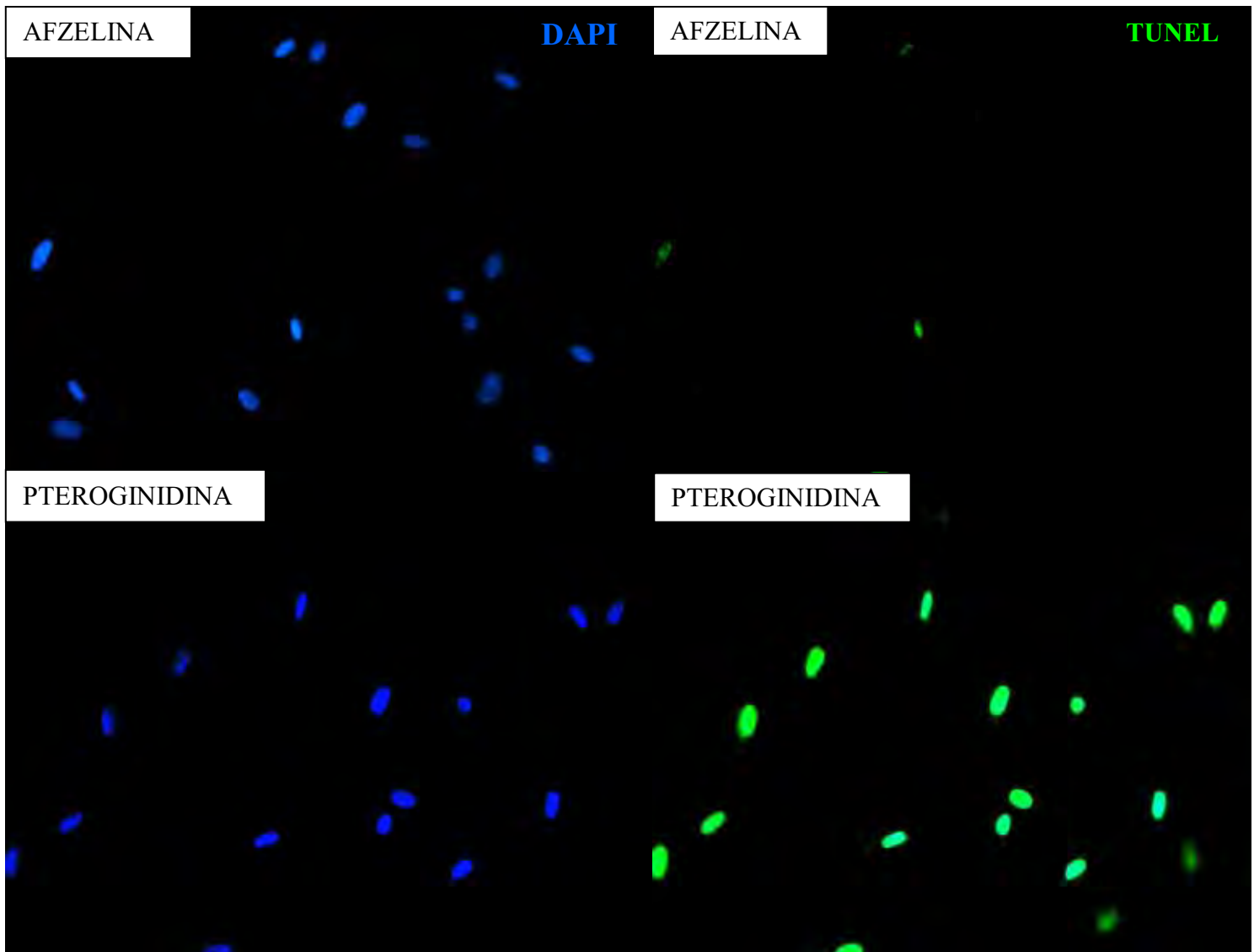


Figura 24. Fotomicrografias da afzelina (50 μ g/mL) e da pteroginidina (1,56 μ g/mL) obtidas através da técnica de TUNEL em microscópio de fluorescência (aumento de 200X). As células foram tratadas com os compostos e fotomicrografias foram tiradas do mesmo campo com filtros diferentes. Células em azul (marcadas com DAPI) e em verde (marcadas com TUNEL). A indução da apoptose é indicada pela cor verde devido a incorporação de TUNEL. Nas células tratadas com o alcalóide pteroginidina ocorreu um grande aumento na taxa de apoptose.

5.5.4. Ensaios de invasão

Os ensaios de invasão foram realizados em câmara dupla utilizando-se matrigel. Como pode ser observado na Figura 25, todos os compostos testados causaram um significativo decréscimo na capacidade migratória das células HUVEC. Novamente, a fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* e o alcalóide pteroginina apresentaram os melhores resultados, inibindo 7 e 24 vezes mais a migração, respectivamente, em relação ao controle.

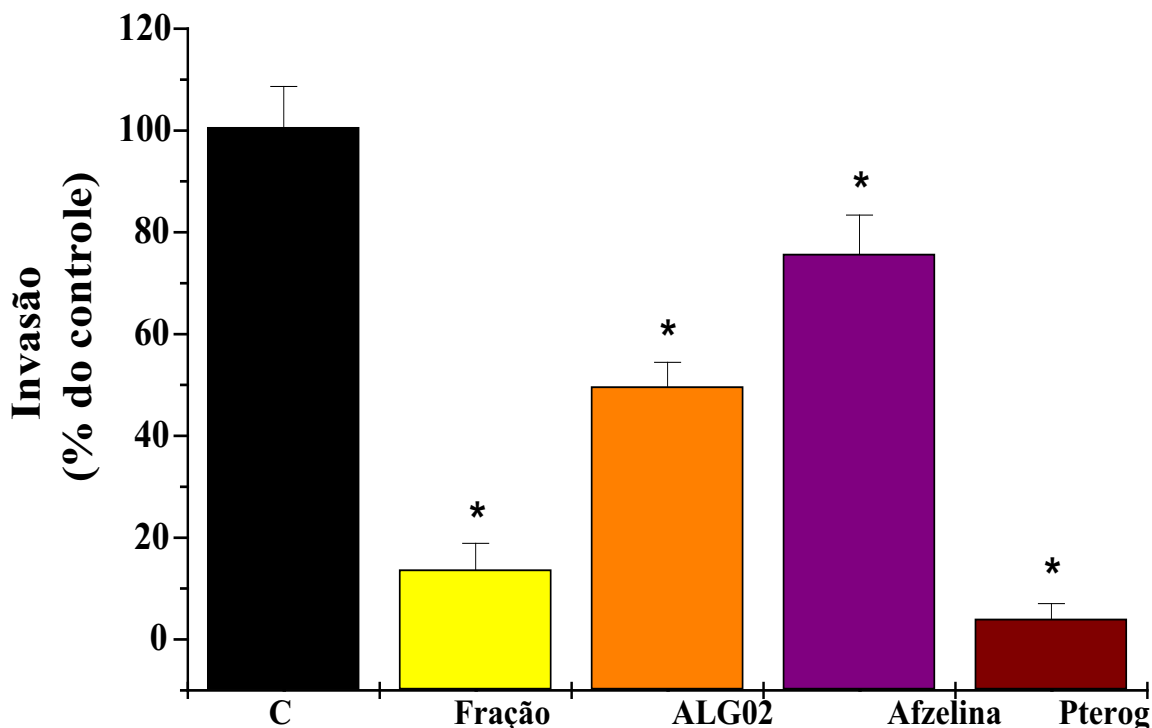


Figura 25. Efeitos da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) na capacidade invasiva das células HUVEC em câmara dupla com matrigel. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células controle (C). Cada barra representa a média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnett. * p<0,01 quando comparados ao controle (C).

5.5.5. Avaliação da formação de estruturas tipo capilares pelas células HUVEC

Inicialmente, as CE devem se unir em estruturas tipo capilares para, em seguida, construírem um novo vaso sanguíneo. As células HUVEC podem desenvolver essas estruturas quando cultivadas em matrigel. Desse modo, a capacidade de afetar a formação de estruturas tipo capilares foi avaliada incubando-se células HUVEC e os compostos estudados em matrigel. A formação de estruturas altamente ramificadas foi observada no controle (meio M199 e 0,1% de DMSO). Contudo, a presença da fração, do extrato ALG-02 e da pteroginidina reduziram drasticamente o número de estruturas tipo capilares. Os resultados da fração, do ALG-02 e da pteroginidina equivalem a $0,40\% \pm 0,55\%$, $6,42\% \pm 3,6\%$ e $0,20\% \pm 0,45\%$ do valor do controle, respectivamente. A afzelina também apresentou atividade inibitória sobre essas estruturas, porém esse flavonóide foi menos potente do que os outros compostos testados ($58,39\% \pm 7,91\%$) (Figura 26). Em comparação com o controle, as ramificações praticamente desapareceram quando as células HUVEC foram tratadas com a fração e a pteroginidina e apenas células indiferenciadas com formas arredondadas puderam ser observadas no microscópio invertido (Figura 27).

Esses resultados mostram que os compostos testados podem inibir a formação dos vasos, uma etapa crucial do processo angiogênico.

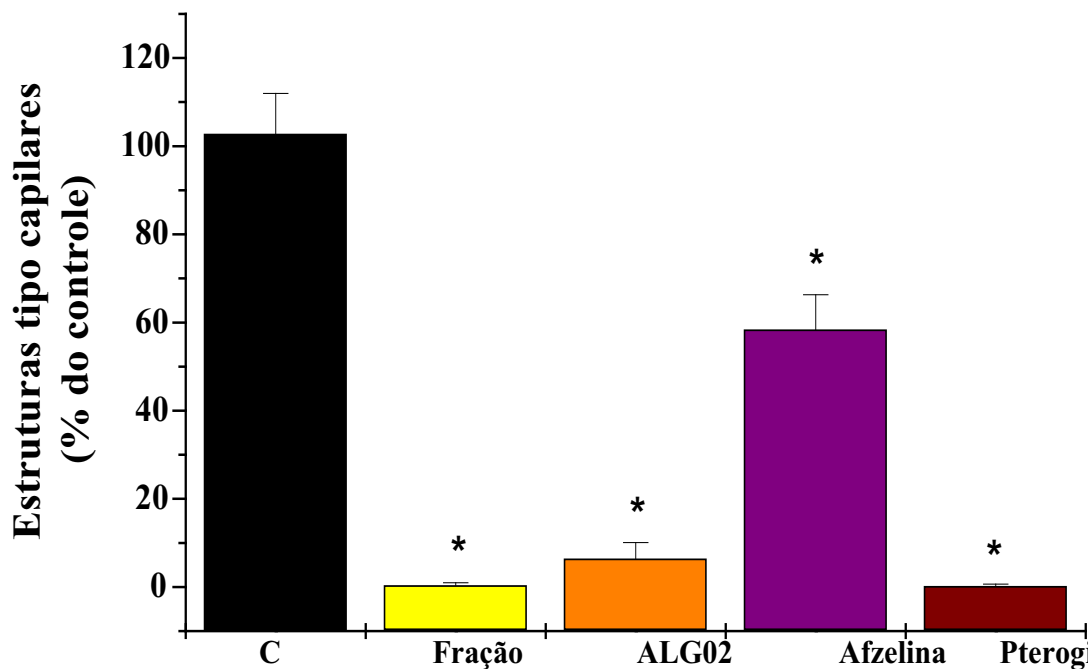


Figura 26. Semiquantificação das estruturas tipo capilares utilizando-se células HUVEC tratadas com a fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), do extrato de fungo endófito ALG-02 (100µg/mL), da afzelina (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL). Reduzido número de estruturas tipo capilares são formadas após incubação com os compostos. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células controle (C). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * $p < 0,01$ quando comparados ao controle (C).

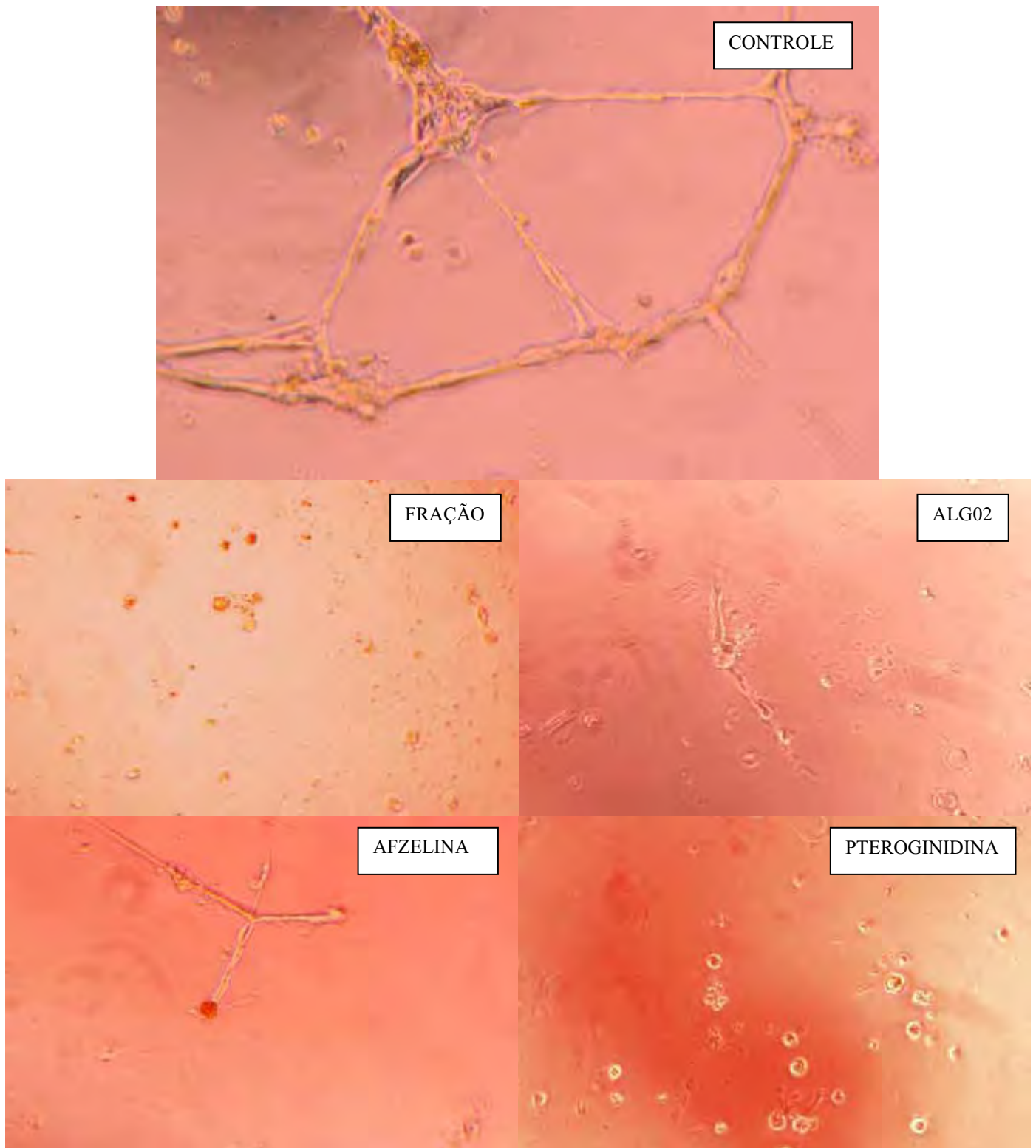


Figura 27. Formação de estruturas tipo capilares em culturas de células HUVEC após o tratamento com a fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL), com o extrato de fungo endofítico ALG-02 (100µg/mL), com a afzelina (50µg/mL) e com a pteroginidina (1,56µg/mL). As fotomicrografias representam a cultura celular. Os ensaios foram realizados em triplicata e visualizados através de microscópio invertido (aumento de 400X). Em contraste com as células controle, o tratamento com os compostos resultou na diminuição ou desaparecimento das ramificações e na presença de células indiferenciadas.

5.5.6. Extração e quantificação das proteínas de células HUVEC tratadas com a fração acetato de etila de *A. glandulosa* e com o alcalóide pteroginidina

A grande variedade de efeitos causados pelos compostos testados em todos os ensaios de angiogênese incentivou a pesquisa da atividade do NFκB com o objetivo de verificar se os compostos estariam afetando a atividade desse fator de transcrição nas células HUVEC. A fração acetato de etila de *A. glandulosa* (50μg/mL) e o alcalóide pteroginidina (1,56μg/mL) foram escolhidos para esse ensaio por terem apresentado os melhores resultados nos testes de angiogênese. Para a determinação da atividade do NFκB, as proteínas das células HUVEC foram previamente extraídas e quantificadas. Os valores encontrados podem ser vistos na Tabela 15.

Tabela 15. Quantificação das proteínas extraídas de células HUVEC.

Composto	Proteínas (μg/mL)
fração acetato de etila de <i>A. glandulosa</i> (50μg/mL)	2607,17
pteroginidina (1,56μg/mL)	1820,18
DMSO 0,1%	1670,70

5.5.7. Determinação da atividade do NFκB

Uma forte diminuição na atividade da subunidade p50 do NFκB foi observada nas células HUVEC após incubação com a fração e o alcalóide indicando que a inativação da sinalização do NFκB é uma das vias utilizadas pelos compostos estudados (Figura 28). É importante ressaltar que a fração foi mais potente em inibir a atividade do NFκB do que o alcalóide isolado.

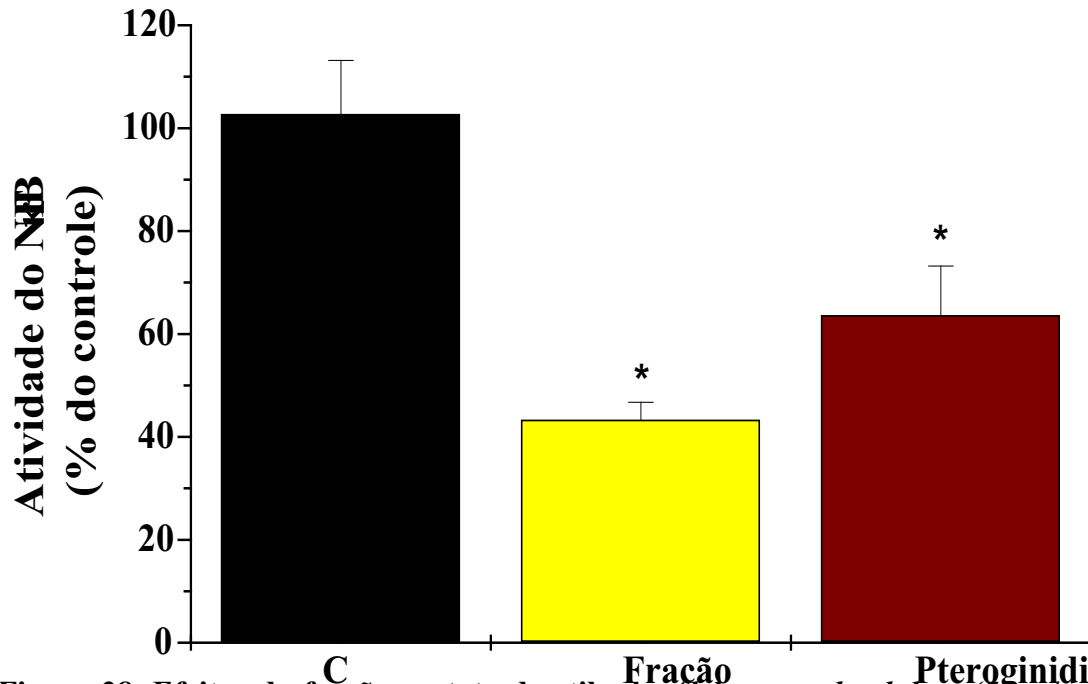


Figura 28. Efeitos da fração acetato de etila de *Alchornea glandulosa* (50µg/mL) e da pteroginidina (1,56µg/mL) na ativação da subunidade p50 do NFκB em células HUVEC. Uma significativa redução da atividade do NFκB foi encontrada nas células tratadas com os compostos em comparação com o controle (C). Cada barra representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o pós-teste de Dunnet. * $p < 0,01$ quando comparados ao controle (C).

5.6. Ensaio *in vivo*

5.6.1. Avaliação do crescimento tumoral

Após o crescimento dos tumores LM2 e LP07 nos camundongos Balb/c, foi realizada a inoculação intratumoral da fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e dos extratos dos fungos endofíticos ALG-A, ALG-02 e ALG-03 estabelecendo-se uma concentração dez vezes maior do que o valor do IC_{50} obtido nos ensaios *in vitro* no item 5.4. Após dez dias de tratamento, os tumores foram removidos, pesados e os volumes calculados (Tabela 16 e 17). A taxa de crescimento também foi calculada através da fórmula descrita no item 4.3.4.3. e os valores podem ser observados na Tabela 18. Grandes variações no peso dos animais não foram observadas. Além disso, os

resultados demonstraram que a fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e o extrato do fungo endofítico ALG-02 podem fortemente inibir o crescimento tumoral tanto de tumores de mama tipo LM2 quanto de tumores de pulmão do tipo LP07. Já o extrato do fungo endofítico ALG-03 é capaz de inibir intensamente o crescimento tumoral induzido pelas células LP07.

Tabela 16. Variações no peso corporal, peso do tumor extraído e volume do tumor extraído em grupos de animais Balb/c portadores de tumores do tipo LM2 e tratados com injeção intratumoral da fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e com os extratos dos fungos endofíticos ALG-A, ALG-02 e ALG-03.

Grupos	Pesos iniciais dos animais (g)	Pesos dos animais com tumor no dia da inoculação dos compostos (g)	Pesos dos animais com tumor no dia da eutanásia (g)	Pesos dos tumores extraídos (g)	Volumes dos tumores extraídos (mm ³)
Controle (MEM)	24,87±2,29	24,87±1,89	27,37±1,89	2,91±0,94	1177,38±456,50
Fração (31,7µg)	22,87±3,09	23,37±2,01	25,37±3,30	1,85±2,09	736,84±812,84
ALG-A (174,2µg)	25,50±1,91	26,40±1,95	28,50±1,91	2,42±0,57	1098,77±360,19
ALG-02 (67,6µg)	24,75±1,50	25,87±2,01	27,00±2,12	1,60±1,24	630,57±479,16
ALG-03 (9,4µg)	24,37±2,01	25,62±0,75	27,37±1,11	2,56±1,43	1196,94±700,14

* Resultados não estatisticamente significativos em relação ao grupo controle.

Tabela 17. Variações no peso corporal, peso do tumor extraído e volume do tumor extraído em grupos de animais Balb/c portadores de tumores do tipo LP07 e tratados com injeção intratumoral da fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e com os extratos dos fungos endofíticos ALG-A, ALG-02 e ALG-03.

Grupos	Pesos iniciais dos animais (g)	Pesos dos animais com tumor no dia da inoculação dos compostos (g)	Pesos dos animais com tumor no dia da eutanásia (g)	Pesos dos tumores extraídos (g)	Volumes dos tumores extraídos (mm ³)
Controle (MEM)	19,75±0,29	20,62±0,48	22,00±0,82	1,29±0,40	815,25±396,19
Fração (10,1µg)	20,00±0,58	20,25±0,96	21,75±1,44	0,95±0,55	472,21±299,40
ALG-A (45,3µg)	20,12±1,11	20,87±0,95	22,87±1,03	1,52±0,30	928,86±246,42
ALG-02 (7,9µg)	21,25±1,55	22,00±1,08	22,12±2,25	0,87±0,25	495,88±202,37
ALG-03 (34,4µg)	22,00±1,78	22,25±0,64	23,50±1,58	0,83±0,50	364,98±259,61

* Resultados não estatisticamente significativos em relação ao grupo controle.

Tabela 18. Avaliação da taxa de crescimento dos tumores do tipo LM2 e LP07 em grupos de animais Balb/c tratados com injeção intratumoral da fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e com os extratos dos fungos endofíticos ALG-A, ALG-02 e ALG-03.

Grupos	Taxa de crescimento (%)	
	LM2	LP07
Fração	- 37,42	- 42,08
ALG-A	- 6,68	+13,93
ALG-02	- 46,44	- 39,17
ALG-03	+ 1,66	- 55,23

Resultados obtidos comparando-se com o grupo controle.

(-) inibição do crescimento do tumor /(+) estímulo ao crescimento do tumor.

VI – DISCUSSÃO

A história do desenvolvimento de medicamentos teve sua base fortemente estabelecida através do estudo de produtos naturais utilizados no tratamento de doenças durante vários séculos (RISHTON, 2008). Atualmente, mais de cem compostos derivados de produtos naturais estão sendo submetidos a ensaios clínicos, sendo que pelo menos outros cem compostos encontram-se em fase de desenvolvimento pré-clínico. A maioria desses compostos é derivada de plantas ou microrganismos (HARVEY, 2008).

A flora brasileira, uma das mais diversas do mundo, é um interessante local para a prospecção de novas moléculas devido à diversidade de espécies e a associada riqueza química (YOUNES et al., 2007). Sabe-se que plantas da floresta tropical representam uma rica fonte de substâncias potencialmente imunomodulatórias e que plantas das florestas brasileiras são fontes importantes de novos medicamentos antitumorais (SUFFREDINI et al., 2006; SUFFREDINI et al., 2007; WILLIAMS, 2001; YOUNES et al., 2007). Além disso, o cerrado brasileiro é considerado um *hotspot* mundial, isto é, uma área prioritária para conservação, devido à elevada ameaça de extinção e a grande biodiversidade existente (MYERS et al., 2000).

Alchornea glandulosa Poepp & Endl. (Euphorbiaceae) é uma planta distribuída do sudeste ao sul do Brasil, principalmente na Mata Atlântica e no Cerrado (LORENZI, 1992). Estudos anteriores realizados demonstraram a atividade antiinflamatória da fração acetato de etila extraída dessa planta. Além disso, durante os ensaios com a planta *A. glandulosa*, observou-se também grande citotoxicidade da fração acetato de etila em células tumorais do tipo L929 que seriam utilizadas nos experimentos de determinação da citocina TNF- α (LOPES, 2004; LOPES et al., 2005). Desse modo, neste trabalho, foi dada continuidade ao estudo da atividade antiinflamatória dos

compostos isolados dessa planta e também foram realizados ensaios para verificar uma possível ação antitumoral e antiangiogênica.

É importante considerar que algumas plantas produtoras de compostos bioativos possuem endófitos associados a elas que produzem, exatamente, esses mesmos compostos. Relatos como o do taxol, inicialmente isolado de *Taxus brevifolia* e, em seguida, de diversos endófitos desta e de outras plantas que o produzem, sugerem um relacionamento entre planta e microrganismo que deve ser mais explorado (SOUZA et al., 2004; STIERLE et al., 1993; STROBEL et al., 1993). Esta pesquisa é necessária para que haja uma melhor compreensão das interações endófitos-plantas e, deste modo, seja possível o desenvolvimento de novas perspectivas sobre a importância dos microrganismos endofíticos de plantas brasileiras, área praticamente inexplorada e com grandes potencialidades. Assim, foi verificado, concomitantemente, neste trabalho, se extratos de fungos endofíticos poderiam apresentar efeitos similares aos dos compostos obtidos da planta. Portanto, foi feito um estudo abrangente com a planta *A. glandulosa* e com os fungos endofíticos nela presentes, determinando-se a capacidade desses extratos exibirem atividades biológicas.

Em geral, a inflamação é um processo intensamente regulado, contudo uma falta de equilíbrio entre os sinais que iniciam e desligam esse processo resulta em danos celulares e teciduais. Na inflamação, as três grandes funções dos macrófagos são a apresentação de antígenos, a fagocitose e a imunomodulação através da produção de citocinas, fatores de crescimento e intermediários reativos do nitrogênio e oxigênio. Assim, os macrófagos possuem um papel crítico no início, na manutenção e na resolução da inflamação, sendo que a remoção dos mediadores produzidos por essas células inibe a inflamação e permitem o reparo tecidual. Uma vez que os macrófagos produzem uma série de moléculas biologicamente ativas que participam do processo

inflamatório, intervenções terapêuticas que têm como alvo essas células ou seus produtos podem criar novos métodos de controle das doenças inflamatórias (ESKEW et al., 1989; FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; HOBBS et al., 1999).

Na avaliação das atividades antiinflamatórias dos compostos obtidos da planta *A. glandulosa* e dos fungos endofíticos, foram utilizadas culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c e os estudos foram iniciados com os testes de viabilidade dessas células. A questão da viabilidade é fundamental durante o desenvolvimento das manipulações experimentais, assegurando, dessa forma, a capacidade de uma determinada população celular responder às substâncias a serem testadas (FRESHNEY, 1994). Através dos testes de viabilidade fica garantido que as concentrações dos compostos testados são adequadas e não causam citotoxicidade significativa às culturas de macrófagos na presença e ausência de LPS. Ainda foi possível verificar que as células estavam em condições apropriadas para os ensaios *in vitro* e que os efeitos inibitórios dos compostos testados na produção de NO e citocinas não eram devidos à citotoxicidade (Figuras 7 e 8, Tabela 1).

É importante ressaltar que o NO e as citocinas pró-inflamatórias são os maiores alvos no tratamento das doenças inflamatórias. Além disso, o LPS é uma importante endotoxina que induz o choque séptico e a produção desses mediadores (HOBBS et al., 1999; LEE et al., 2003). Neste trabalho, utilizamos culturas de macrófagos estimuladas e não estimuladas por LPS na avaliação da produção de NO e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 pelos compostos obtidos da planta *A. glandulosa* e também pelos extratos de fungos endofíticos. Em culturas de macrófagos não estimulados por LPS, foi observado que esses compostos não foram capazes de induzir a produção de NO e de nenhuma das citocinas em todas as concentrações testadas (Tabelas 2, 4, 5, 6 e 7). Por outro lado, quando os macrófagos foram ativados

com LPS e incubados com esses mesmos compostos, houve uma inibição significativa na produção do mediador inflamatório NO e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 de maneira dose-dependente e em diferentes níveis, no entanto, sem causar citotoxicidade (Figuras 9-18 e Tabelas 3, 8, 9, 10 e 11). Dessa maneira, todos os compostos testados demonstraram atividade antiinflamatória e são potencialmente benéficos no tratamento de diversas condições associadas à superprodução desses mediadores, incluindo o choque séptico, doenças cardiovasculares e reumáticas, síndromes neurodegenerativas e inflamações (HOBBS et al., 1999; KANDA; TAKAHASHI, 2004; ROSMARIN; STROBER, 2005; SETTY; SIGAL, 2005; SOUTHAN; SZABÓ, 1996; SPELMAN et al., 2006).

Foram excelentes os resultados encontrados neste trabalho quando os extratos de fungos endofíticos foram avaliados quanto à capacidade de exibirem atividades antiinflamatórias. O extrato de fungo endofítico ALG-02 inibiu aproximadamente 100% da produção de NO, 98,71% da produção de TNF- α , 89,39% da produção de IL-1 β , 99,74% da produção de IL-6 e ainda 86,79% da produção de IL-12, sendo considerado o composto que apresentou o maior potencial antiinflamatório nesta pesquisa. O extrato de fungo endofítico ALG-03 também exibiu alta capacidade antiinflamatória, inibindo 96,67% da produção de TNF- α , 73,46% da produção de IL-6 e 87,70% da produção de IL-12. Além disso, o extrato ALG-A também foi capaz de inibir até 95,62% da produção de NO, 98,56% da produção de TNF- α , 82,29% da produção de IL-1 β , 78,46% da produção de IL-6 e 80,66% da produção de IL-12.

Vários trabalhos já demonstraram que compostos obtidos de fungos endofíticos possuem atividades antimicrobiana, citotóxica, amebicida e antimalárica (BASHYAL et al., 2005; BOONMAN et al., 2008; HUANG, Y.J. et al., 2001; SONG et al., 2004;

WIYAKRUTTA et al., 2004). Contudo, ainda existem poucos estudos com relação ao potencial imunomodulador e antiinflamatório desses compostos.

Ren et al. (2008) acreditam que a colutellin A, novo peptídeo isolado do fungo endofítico *Colletotrichum dematium* presente nas plantas *Pteromischum* sp. da floresta tropical da Costa Rica, possui uma potencial atividade imunossupressora. Este composto inibiu a produção de interleucina-2 (IL-2) em células T CD4+ ativadas, sem causar citotoxicidade.

Além disso, já foram isolados da planta *Tripterygium wilfordii*, utilizada tradicionalmente pela medicina chinesa no tratamento de doenças auto-imunes, uma variedade incrível de fungos endofíticos. Foi surpreendente a observação de que os compostos subglutinol A e B obtidos do fungo endofítico *Fusarium subglutinans* isolados dessa planta podem influenciar o sistema imunológico, sendo considerados agentes imunossupressores (LEE et al., 1995). É importante ressaltar que o subglutinol A e B possuem atividades imunossupressoras semelhantes à da planta hospedeira e também têm similaridades estruturais aos triptolídeo e derivados, compostos ativos encontrados na planta (STROBEL et al., 1996).

Por fim, ainda foi isolado da *T. wilfordii* o fungo endofítico *Pestalotiopsis leucothēs*. Os efeitos imunomodulatórios de três compostos obtidos desse fungo e designados como BS, YS e GS foram avaliados. BS diminuiu significativamente a produção das citocinas IL-1 β , IFN- γ e TNF- α em células mononucleares de sangue periférico (PBMNC). Esse composto ainda inibiu a proliferação dessas células e a expressão do receptor de IL-2, indicando que ele é um imunossupressor específico de células T. BS também suprimiu moderadamente a produção dos anticorpos IgG e IgM, sugerindo que esse composto também exerce efeitos imunossupressores em linfócitos B. YS foi 10% menos ativo do que BS em todos os ensaios e GS tanto inibiu quanto

estimulou a proliferação das células PBMNC na presença de diferentes estímulos. GS ainda inibiu a produção de interleucina-4 (IL-4), de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM). Os autores acreditam que esse três compostos, BS, YS e GS, são potentes imunomoduladores e exercem efeitos variados tanto em células T e B quanto em monócitos, explicando, ainda que parcialmente, as atividades imunossupressoras da planta *T. wilfordii*. Assim, os autores esperam que esses compostos possam representar uma nova fonte de compostos imunomoduladores úteis no tratamento das doenças imunológicas (KUMAR et al., 2005).

Com relação à capacidade antiinflamatória de compostos produzidos por fungos endofíticos, apenas duas pesquisas foram encontradas até o momento. Phomol, um composto isolado de espécies de fungos endofíticos do gênero *Phomopsis* presentes na planta *Erythrina crista-galli*, mostrou interessante atividade antiinflamatória no modelo de edema de orelha em camundongos (WEBER et al., 2004). E o lolitrem B e seu isômero 31-epilolitrem B, dois compostos produzidos por fungos endofíticos, inibiram significativamente a produção de TNF- α e IL-6 em culturas de macrófagos RAW 264.7 estimuladas por LPS. Os autores acreditam que devido à capacidade de inibir citocinas que esses compostos apresentam, eles terão grande potencial imunoterapêutico no tratamento de doenças inflamatórias no futuro (WONG et al., 2006).

É importante mencionar que foram descritas 72.000 espécies de fungos, porém estima-se que haja pelo menos 1,5 milhões de espécies no mundo (HAWKSWORTH, 2001). Observou-se ainda que aproximadamente 25% de todos os produtos naturais biologicamente ativos conhecidos atualmente foram obtidos a partir dos fungos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994; NEWMAN; CRAGG, 2007). Desse modo, é possível concluir que a triagem do diverso grupo de fungos endofíticos é uma abordagem

promissora para a obtenção de compostos raros de plantas na escala comercial dos microrganismos (STROBEL; DAISY, 2003).

A planta *A. glandulosa* é encontrada em regiões tropicais do Brasil. Segundo Bill et al. (2002), as pesquisas com plantas tropicais são mais promissoras do que com plantas de outras regiões. Os autores descobriram uma distinção metabólica entre endófitos de regiões tropicais e temperadas através de dados estatísticos que comparam o número de produtos naturais bioativos isolados de endófitos de cada um desses locais. Eles notaram que os endófitos de regiões tropicais produzem mais produtos ativos do que os endófitos de regiões temperadas. Esta observação mostra a influência da planta hospedeira no metabolismo de microrganismos endofíticos.

Na procura de novos agentes antiinflamatórios de origem natural, a fração acetato de etila de *A. glandulosa* inicialmente foi estudada e mostrou excelentes resultados (Figuras 10, 12, 14, 16, 18 e Tabelas 3, 8-11). Assim, para avaliar se haveria um composto específico responsável pelos efeitos observados com a fração, os cinco compostos puros isolados a partir dela foram investigados. Portanto, foram estudados nesse trabalho, dois alcalóides isômeros pteroginina e pteroginidina, dois flavonóides isoquercitrina e afzelina e ainda o ácido gálico. Surpreendentemente, tanto a fração bruta quanto os compostos puros inibiram a produção de NO e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 de maneira dose-dependente e em diferentes proporções. A fração acetato de etila merece ser destacada uma vez que inibiu 88,36% da produção de NO e 87,09% da produção de IL-1 β . Os alcalóides pteroginina e pteroginidina, apesar da isomeria, mostraram atividades diferentes. A pteroginina inibiu, aproximadamente, 100% e 81,89% da produção de TNF- α e de IL-1 β , respectivamente. Já a pteroginidina inibiu fortemente a produção de NO, em torno de 78,18%. O flavonóide isoquercitrina exibiu os melhores resultados nos ensaios de IL-6, inibindo

72,79% da produção dessa citocina, enquanto que a afzelina inibiu significativamente a produção de IL-12, ao redor de 89,90%. Por sua vez, o ácido gálico teve uma maior capacidade de inibir o TNF- α e a IL-12, respectivamente em 92,58% e 79,56%.

De modo semelhante a este trabalho, o extrato metanólico e as frações obtidas das folhas de *Morus alba* foram testados quanto à produção de NO e TNF- α em macrófagos estimulados por LPS. Tanto o extrato quanto as frações inibiram a produção de NO e TNF- α e os autores acreditam que a *M. alba* possa prevenir o dano tecidual que ocorre durante a sepse através da supressão desses mediadores inflamatórios (CHOI; HWANG, 2005).

Outro exemplo é o extrato etanólico da planta *Kummerowia striata*, tradicionalmente utilizada no tratamento de doenças inflamatórias na medicina tradicional chinesa. O extrato etanólico dessa planta inibiu significativamente a produção de NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 de maneira dose-dependente (TAO et al., 2008).

Muitos compostos puros obtidos de plantas inibiram a produção de NO e citocinas. Uma vez que o NO e as citocinas têm importantes papéis no processo inflamatório, a inibição desses mediadores pode explicar o efeito antiinflamatório de muitos compostos (TAO et al., 2008).

A tanshinona IIA, um diterpeno isolado das raízes de *Salvia miltiorrhiza*, marcadamente inibiu a produção de NO, TNF- α e IL-1 β de maneira dose-dependente. Os autores acreditam que o uso tradicional de *S. miltiorrhiza* como um medicamento antiinflamatório possa ser explicado, pelo menos em parte, pela inibição do NO e das citocinas (JANG et al., 2003).

Outro composto importante é a hipericina. Encontrado no *Hypericum perforatum*, esse composto ativo inibiu significativamente a produção de IL-12 de maneira dose-dependente em macrófagos ativados por LPS. Uma vez que evidências

recentes mostram um papel crítico da IL-12 na patogênese de várias doenças como esclerose múltipla, doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatóide e doença do enxerto versus hospedeiro, os autores acreditam que os resultados encontrados possam explicar algumas das atividades biológicas da hipericina, incluindo seu efeito anti-reumático (KANG et al., 2001).

Além disso, é importante ressaltar que a atividade antiinflamatória do ácido gálico foi estudada em mastócitos humanos. Do mesmo modo que neste trabalho, este composto foi capaz de inibir a produção de TNF- α e IL-6 (KIM, S.H. et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que o ácido gálico apresenta atividade antiinflamatória segundo modelo de edema de pata de camundongo induzido por zimosan. Estudos *in vitro* revelaram que este composto interfere com a atividade dos leucócitos polimorfonucleares. A capacidade deste composto seqüestrar o ânion superóxido, inibir a liberação e a atividade da mieloperoxidase e interferir com a enzima NADPH-oxidase são alguns dos modos de ação pelos quais acredita-se que o ácido gálico possa inibir a inflamação (KROES et al., 1992).

Contudo, dentre todos os grupos de compostos obtidos de plantas que exibiram a capacidade de inibir a produção de NO e citocinas, os flavonóides merecem destaque. Os flavonóides são compostos fenólicos e têm sua estrutura baseada no 2-fenil-benzopirano (C6C3C6), sendo representados por várias classes, de acordo com o grau de oxidação do anel central (FORMICA; REGELSON, 1995). Esses compostos exibem um notável espectro de atividades biológicas, incluindo efeitos antioxidantes, antivirais, antitumorais e antiinflamatórios (KANDASWAMI et al., 2005; MATSUDA et al., 2003; MIDDLETON et al., 2000).

Vários flavonóides já mostraram inibir a produção de NO em macrófagos estimulados por LPS, entre eles, a apigenina, a luteolina, a quercetina, a wogonina e a

genisteína (KROL et al., 1995; SADOWSKA-KROWICKA et al., 1998). Além disso, a genisteína também inibiu a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em monócitos humanos estimulados por LPS (GENG et al., 1993).

Três flavonóides, epicatequina, quercetina e tilirosideo, foram isolados da planta *Waltheria indica*. Esses flavonóides também inibiram de maneira dose-dependente a produção do mediador inflamatório NO e as citocinas TNF- α e IL-12 em macrófagos murinos. A quercetina foi significativamente mais ativa, inibindo 90% da produção de NO. Os autores acreditam que os resultados proporcionam evidências científicas que suportam o uso tradicional da *W. indica* no tratamento de doenças inflamatórias (RAO et al., 2005b).

As atividades antiinflamatórias de outros cinco flavonóides isolados da *Caesalpinia pulcherrima* foram igualmente avaliadas. 5,7-dimetoxiflavanona, 5,7-dimetoxi-3',4'-metilendioxi-flavanona, isobonducelina, 2'-hidroxi-2,3,4',6'-tetrametoxichalcona e bonducelina inibiram expressivamente a produção de NO, TNF- α e IL-12 de maneira dose-dependente, também suportando o uso desta planta como antiinflamatória (RAO et al., 2005a).

É significativo ainda salientar que as chalconas existem naturalmente nas plantas como precursores de flavonóides. Várias chalconas e derivados também são capazes de inibir a síntese de NO (CHENG et al., 2001; HUANG, Y.C. et al., 2001). Cardamonina, uma chalcona isolada das frutas de *Alpinia rafflesiana* e que possui propriedades antiinflamatórias, inibiu a produção de NO e TNF- α em macrófagos RAW 264.7 (AHMAD et al., 2006).

Várias pesquisas modernas apontam para um potencial uso de compostos de plantas no tratamento da inflamação. Spelman et al. (2006) acreditam que uma estratégia na modulação da expressão de citocinas seria a utilização de compostos

obtidos de plantas. Esses compostos imunomoduladores de origem vegetal poderiam oferecer abordagens modernas no tratamento de uma variedade de doenças, possibilitando por meio da regulação dinâmica de moléculas mensageiras como as citocinas, uma alteração na atividade do sistema imunológico.

A inibição de citocinas, em particular do TNF- α , teve sucesso em vários ensaios clínicos para o tratamento da artrite reumatóide (MORELAND, 1999). Antagonistas de TNF- α e IL-1 β oferecem opções ao tratamento da doença periodontal. Elevados níveis de TNF- α e IL-12 estão relacionados a muitas doenças, incluindo Doença de Crohn e psoríase. Além disso, citocinas pró-inflamatórias têm um papel essencial na patogênese da artrite reumatóide e da osteoartrite. Ainda, na área da oncologia, progressos foram feitos com a inibição terapêutica da IL-6 e IL-12 (DELAPORTE, 2008; SPELMAN et al., 2006; VAN ASSCHE, 2007).

Apesar do uso corrente de medicamentos antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais no tratamento das doenças inflamatórias, esses medicamentos convencionais não tiveram sucesso na cura de desordens inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide e a dermatite atópica. Pesquisadores acreditam que exista uma grande necessidade de se estudar novos e seguros agentes antiinflamatórios e, desse modo, os constituintes obtidos de plantas poderiam ser bons candidatos a esse tipo de pesquisa (KIM et al., 2004).

Choi e Hwang (2005) também esperam que o uso de compostos obtidos de plantas seja uma opção terapêutica no tratamento de inúmeras doenças inflamatórias. Modernas pesquisas na área de medicamentos antiinflamatórios estão direcionadas ao uso de potentes compostos antiinflamatórios com alta tolerabilidade gastrointestinal e reduzido número de efeitos adversos. Uma vez que plantas são utilizadas com sucesso há vários anos na medicina tradicional, sua importância não pode ser esquecida.

Através da história, os produtos naturais proporcionaram uma rica fonte de compostos com muitas aplicações no campo da medicina. Com relação à área de pesquisas sobre o câncer, um número importante de novos medicamentos comercializados tem sido obtido de produtos naturais, através da modificação estrutural de compostos naturais ou ainda pela síntese de novos compostos utilizando o produto natural como um modelo (GORDALIZA, 2007). O domínio dos produtos naturais na área da quimioterapia do câncer é intenso, sendo que 74% dos compostos antitumorais são originados de produtos naturais ou derivados (TAN et al., 2006).

Atualmente, em vários laboratórios, uma grande variedade de plantas medicinais tem sido testada na busca de novos compostos ativos com propriedades antitumorais (DOS SANTOS et al., 2004; LIU et al., 2004; MOONGKARNDI et al., 2004; YOSHIDA et al., 2005; WINTERS, 2006). Neste trabalho, utilizando-se linhagens tumorais LM2 e LP07, foram realizados experimentos *in vitro* para a determinação da atividade citotóxica dos compostos. O potencial citotóxico dos compostos estudados sobre linhagens tumorais foi avaliado através da técnica colorimétrica de MTT. Primeiramente, foi determinado o IC_{50} dos compostos e, em seguida, os valores encontrados foram comparados com o IC_{50} da doxorrubicina. Uma vez que a doxorrubicina possui um imenso valor no tratamento de tumores sólidos e hematológicos e é um medicamento utilizado como tratamento de primeira linha para vários tipos de câncer desde sua descoberta em 1971 (PATIL et al., 2008), este composto foi escolhido como controle nos testes de avaliação da citotoxicidade.

Nos ensaios realizados nesta pesquisa, observou-se que o ácido gálico ($IC_{50}=5,48\mu\text{g/mL}$), o extrato de fungo endofítico ALG-03 ($IC_{50}=9,37\mu\text{g/mL}$) e a pteroginidina ($IC_{50}=18,66\mu\text{g/mL}$) foram fortemente citotóxicos às células tumorais de adenocarcinoma de mama (LM2) com valores de IC_{50} próximos aos da doxorrubicina

($IC_{50}=0,83\mu\text{g/mL}$). Além disso, a afzelina ($IC_{50}=2,31\mu\text{g/mL}$), o ácido gálico ($IC_{50}=3,35\mu\text{g/mL}$), o extrato de fungo endofítico ALG-02 ($IC_{50}=7,87\mu\text{g/mL}$) e a fração acetato de etila de *A. glandulosa* ($IC_{50}=10,15\mu\text{g/mL}$), também demonstraram possuir uma potente atividade citotóxica em relação às células de adenocarcinoma de pulmão (LP07), igualmente com IC_{50} próximos ao controle ($IC_{50}=0,52\mu\text{g/mL}$). É importante ressaltar que os compostos mostraram fortes efeitos citotóxicos nas linhagens tumorais e baixa citotoxicidade nos macrófagos normais. Pelos resultados encontrados, é possível sugerir que esses compostos poderiam atuar como antitumorais inibindo o crescimento de tumores de mama e pulmão.

É importante analisar que os extratos de fungos endofíticos ALG-02 e ALG-03 exibiram alta atividade citotóxica nas células tumorais de adenocarcinoma de pulmão e mama, respectivamente. Guimarães et al. (2008) também observaram alta incidência de atividade citotóxica nos ensaios com os extratos de fungos endofíticos isolados *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. Os autores acreditam que essa alta atividade é devida ao fato de que os metabólitos bioativos secundários, gerados por esses microrganismos, são produzidos como uma tentativa de adaptação a funções específicas na natureza. Uma vez que os fungos endofíticos vivem em um ambiente complexo de interações com a planta hospedeira, com outros endófitos e também com fitopatógenos, pode-se presumir que eles produzam compostos bioativos que possam aperfeiçoar suas habilidades de sobrevivência em ambientes complexos.

Além desses extratos de fungos endofíticos, três novas citocalasinas foram descobertas a partir de *Rhinocladiella* sp, um fungo endofítico também presente na planta *T. wilfordii*. Esses compostos possuem importantes atividades antitumorais (WAGENAAR et al., 2000).

Uma vez que é largamente aceito que microrganismos endofíticos são pouco estudados e representam uma ampla e inexplorada fonte de novos compostos com grandes potencialidades na área médica, Strobel e Daisy (2003) acreditam que os mecanismos através dos quais os endófitos respondem ao seu ambiente devam ser melhor compreendidos na tentativa de prever quais plantas estudar e, desse modo, facilitar o processo de descoberta de novos compostos.

A importância do estudo da atividade citotóxica de produtos naturais está relacionada com o fato de o câncer ser um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Diversos compostos isolados de plantas já demonstraram atividades citotóxicas em várias linhagens celulares. Esta pesquisa mostrou que a fração acetato de etila possui grande capacidade citotóxica, provavelmente devido à sua composição, uma mistura de importantes moléculas. Além da fração, os compostos puros ácido gálico, pteroginidina e afzelina também exibiram excelentes resultados.

O ácido gálico é o composto que merece um maior destaque nos ensaios de citotoxicidade pelos excelentes resultados demonstrados nas duas linhagens tumorais estudadas. O ácido gálico consiste em uma estrutura fenólica tri-hidroxilada que possui forte atividade antioxidante e é capaz de inibir a formação de tumores em vários modelos de estudo do câncer (JAGAN et al., 2008; RAINA et al, 2008). Faried et al. (2007), isolaram ácido gálico das frutas de uma planta medicinal da Indonésia chamada *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Esse composto inibiu significativamente a proliferação de várias linhagens tumorais e induziu a apoptose de células tumorais de esôfago. Além disso, o ácido gálico foi capaz aumentar a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e ativar a cascata de caspases. Adicionalmente, o ácido gálico reduziu os níveis das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Xiap. Os autores acreditam que o ácido gálico pode ser considerado um bom composto antitumoral.

Além disso, o ácido gálico é um dos principais antioxidantes do vinho tinto e do chá verde e é frequentemente um componente de taninos hidrolisáveis em plantas (GRAHAM et al., 1992; GRUNDHÖFER et al., 2001; KIM et al., 2008). Tanimura et al. (2005), citam a capacidade de taninos hidrolisáveis inibirem a ação invasiva de células tumorais, via inibição das matrizes metaloproteinases 2 e 9, que estão associadas ao aumento do potencial metastático em muitas células tumorais. Yang et al. (2000) também observaram a indução da apoptose em células leucêmicas por taninos hidrolisáveis da *Eugenia lambos L.*

Neste trabalho, o alcalóide guanidínico pteroginidina foi citotóxico às células tumorais de adenocarcinoma de mama (LM2). Entre os tipos de compostos obtidos de plantas, os alcalóides têm sido tradicionalmente pesquisados devido à sua pronunciada gama de atividades (KUTCHAN, 1995). Os mais famosos exemplos de alcalóides antitumorais são o taxol, obtido da planta *Taxus brevifolia* e clinicamente disponível desde 1994, e a camptotecina e seus derivados, obtidos da planta *Camptotheca acuminata* e atualmente em fase de ensaios clínicos (KINGSTON; NEWMAN, 2007; OBERLIES; KROLL, 2004; RAM; KUMARI, 2001). O alcalóide taspina, encontrado no látex viscoso de cor vermelha extraído de *Croton spp* e chamado de Sangue-de-drago, é também considerado um potente agente antitumoral (WILLIAMS, 2001) e a homoharringtonina, um alcalóide isolado da árvore chinesa *Cephalotaxus harringtonia* (Cephalotaxaceae), mostrou eficácia contra vários tipos de leucemias (KANTARJIAN et al., 1996).

No reino vegetal, os alcalóides guanidínicos são restritos às famílias Euphorbiaceae e Leguminosae (BOLZANI et al., 1995). Em estudos anteriores, Bolzani et al. (1995) analisaram a atividade citotóxica da pteroginidina em cepas geneticamente

modificadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Este alcalóide foi ativo em cepas mutantes RS 321, sugerindo seu potencial como agente antitumoral.

Outra planta do gênero *Alchornea* também possui alcalóides guanidínicos. *Alchornea cordifolia* é uma das plantas mais utilizadas na medicina tradicional africana, principalmente devido às suas propriedades antiinflamatórias, antimicrobianas e antiparasíticas (MAVAR-MANGA et al., 2008). Dois alcalóides guanidínicos, *N1*, *N2*-diisopentenil guanidina e *N1,N2,N3*-triisopentenil guanidina, isolados da raiz de *A. cordifolia*, mostraram propriedades citotóxicas em células tumorais (MAVAR-MANGA et al., 2006).

Contudo, alcalóides não são encontrados exclusivamente em plantas. Eles já foram isolados de numerosas fontes animais (BUCHANAN et al., 2002). Alcalóides guanidínicos estão presentes em organismos marinhos e exibem uma série de atividades biológicas, como por exemplo, citotoxicidade contra células tumorais e inibição da fusão do vírus da imunodeficiência humana, HIV-1 (BOUAICHA et al., 1994; CHANG et al., 2003; SOREK et al., 2006).

Na pesquisa de produtos naturais biologicamente ativos, os flavonóides requerem destaque. São compostos que demonstram efeitos biológicos positivos em relação à prevenção do câncer através da inibição da proliferação de vários tipos de células tumorais (AMMAR et al., 2008; WANG et al., 2007). Neuhouser (2004) revisou dezenas de publicações e encontrou uma diminuição no risco de câncer de 40% a 58% entre as pessoas que mais ingeriam os alimentos ricos em flavonóides em comparação com as que menos ingeriam, após períodos que variaram de 13 a 30 anos de seguimento. Os alimentos que contêm flavonóides demonstraram efeito protetor contra câncer de pulmão, estômago, próstata, rim, cólon e reto.

A angiogênese tem sido descrita como uma peça chave no processo do câncer, tendo um papel fundamental no crescimento tumoral, na invasão do tumor e nas metástases. Em muitas patologias, incluindo a inflamação crônica, a retinopatia diabética, a artrite reumatóide e a arteriosclerose, um persistente estímulo à angiogênese é uma característica comum (QUESADA et al., 2006). Este complexo processo de várias etapas compreende a degradação da matrix extracelular, a proliferação das CE, a migração e a anastomose. A finalização é realizada com o recrutamento e a adesão dos pericitos ou células musculares lisas (COSTA et al., 2007). A importância central da angiogênese e o entendimento de como ocorre a formação de novos vasos sanguíneos motivaram a descoberta de novas terapias destinadas a interromper esse processo (MILLER et al., 2001).

Devido à relação entre NO e angiogênese e baseando-se nos excelentes resultados obtidos nos ensaios de inibição de NO (Figuras 9 e 10, Tabela 3), a fração acetato de etila de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02 e os compostos puros afzelina e pteroginidina foram escolhidos para os testes de angiogênese. Assim, na procura de novos produtos naturais com atividade antiangiogênica, o efeito desses compostos foram estudados no processo angiogênico, investigando-se a proliferação, a migração, a invasão e a formação de estruturas tipo capilares em células HUVEC.

Recentemente, a angiogênese tem sido considerada um alvo para fármacos antiinflamatórios não esteroidais. E nesse contexto, as CE representam o alvo preferencial para a terapia, uma vez que é um tipo celular comum a todos os tumores sólidos. Apesar de cada tipo de câncer ser uma doença única, o endotélio tumoral é relativamente uniforme, sendo um tipo celular normal (TOSETTI et al., 2002).

A primeira estratégia experimental na busca de novos compostos antiangiogênicos inicia-se com a procura de inibidores de CE (QUESADA et al., 2006).

Nos estudos de angiogênese, novamente foram definidas as concentrações ideais de cada composto através da porcentagem de viabilidade das células HUVEC nos ensaios de MTT (Figura 19, Tabela 14). A seguir, foi demonstrado, nos vários ensaios *in vitro*, que todos os compostos testados possuem atividade antiangiogênica em diferentes graus. Houve uma grande diminuição na porcentagem das células proliferativas nos ensaios com BrdU com todos os compostos testados. Porém, o alcalóide pteroginidina exibiu um excelente resultado, mostrando uma drástica redução da proliferação das CE, cerca de 8 vezes menor que o controle (Figuras 20 e 21).

Adicionalmente, a apoptose aparece ser fundamental no início do processo antiangiogênico (NOR; POLVERINI, 1999). No presente estudo, um grande aumento na taxa de apoptose ocorreu nas culturas de células HUVEC tratadas com a fração acetato de etila de *A. glandulosa* e com o alcalóide pteroginidina (Figuras 22-24). A fração foi capaz de induzir um aumento de aproximadamente 19 vezes na taxa de apoptose, enquanto que a elevação causada pela pteroginidina foi de 14 vezes. Esses resultados eram esperados uma vez que efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em células tumorais já foram descritos com outros compostos de plantas (CHENG et al., 2007; PILARSKI et al., 2007), sugerindo que um mecanismo similar está provavelmente ocorrendo nas CE.

O comportamento invasivo é outra característica importante na angiogênese. A capacidade invasiva requer a degradação da matriz extracelular e envolve a ativação de vários sinais nas CE. Os resultados desta pesquisa mostraram um grande decréscimo da capacidade invasiva das células HUVEC tratadas com todos os compostos testados, sendo que a fração e o alcalóide pteroginidina causaram uma inibição, aproximadamente, 7 e 24 vezes maior do que o controle (Figura 25).

Em conformidade com os resultados desta pesquisa, Quesada et al. (2006) mostraram que a esqualamina (Sq), um produto natural isolado do tubarão *Squalus acanthias*, inibe a angiogênese e o crescimento tumoral, pelo menos em parte, bloqueando a proliferação e a migração das CE e assim prevenindo a neovascularização tumoral. Os autores ainda propõem que a Sq possui um enorme potencial na terapia antiangiogênica não invasiva das desordens oculares, sendo atualmente avaliada no tratamento da degeneração macular relacionada à idade.

Finalmente, a atividade antiangiogênica dos compostos foi confirmada nos ensaios de formação de estruturas tipo capilares em matrigel. As CE devem se unir em estruturas tipo capilares com o objetivo de formar um novo vaso. Neste trabalho, foi demonstrado que todos os compostos estudados foram capazes de prevenir a formação dessas estruturas em matrigel. A presença da fração, do extrato ALG-02 e da pteroginidina reduziram drasticamente o número de estruturas tipo capilares. É surpreendente observar que as estruturas em forma de rede, exibidas normalmente com as células controle, não foram encontradas quando as células HUVEC foram incubadas com fração e com a pteroginidina. Apenas células isoladas foram observadas no microscópio invertido, indicando que esses compostos podem fortemente interromper a formação dos vasos (Figuras 26 e 27). Devido à forte dependência da angiogênese na formação tumoral e aos excelentes resultados encontrados nesta pesquisa, é possível propor que os compostos estudados podem inibir o crescimento tumoral através da supressão do desenvolvimento dos vasos sanguíneos, sendo potenciais agentes antitumorais.

Similar a este trabalho, a sinomenina (Sn), um alcalóide extraído da planta medicinal chinesa *Sinomenium acutum* e utilizado no tratamento da artrite reumatóide na China por mais de 2000 anos, foi capaz de interromper a formação dos vasos

sanguíneos em matrigel. Uma vez que essa formação mimetiza o processo de angiogênese, dependendo da migração e da diferenciação morfológica das células, Kok et al. (2005) propuseram que a Sn inibe a angiogênese induzida pelo fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). Os autores também acreditam que a formação dos vasos sanguíneos é altamente baseada na adesão e dissociação das células e esse fato mostra a possibilidade de que moléculas de adesão presentes nas células HUVEC como, por exemplo, as ICAM-1 ou E-selectinas, possam ser moduladas pelo alcalóide.

Desse modo, os resultados deste trabalho indicam o potencial dos compostos estudados como agentes antiangiogênicos e ainda estão de acordo com outras informações observadas na literatura, onde vários efeitos de produtos naturais na angiogênese são explicados. Muitas plantas e compostos obtidos delas são tradicionalmente utilizados no tratamento do câncer e exibem atividade antiangiogênica através de múltiplos processos interdependentes, como por exemplo, efeitos na expressão gênica, na sinalização celular ou em atividades enzimáticas. *Artemisia annua*, *Viscum album*, *Curcuma longa* (curcumina), *Scutellaria baicalensis*, resveratrol e proantocianidinas (extrato de semente de uva), *Magnolia officinalis*, *Camellia sinensis* (chá verde), *Ginkgo biloba*, quercetina, *Poria cocos*, *Zingiber officinalis* (gengibre), *Panax ginseng*, *Rabdosia rubescens* são alguns exemplos. Uma potencial vantagem dos fitoquímicos é que eles são capazes de agir em múltiplas vias de sinalização celular e, desse modo, podem reduzir o desenvolvimento de resistência nas células tumorais (SAGAR et al., 2006).

A relação entre inflamação crônica e desenvolvimento do câncer já está bem estabelecida há um longo tempo, contudo experimentos atuais tentam demonstrar o papel das citocinas pró-inflamatórias na angiogênese fisiológica e patológica. É certo que as interações entre essas citocinas e as células presentes no microambiente tumoral,

incluindo as células tumorais, as células inflamatórias e as CE, precisam ainda ser melhor esclarecidas (NALDINI; CARRARO, 2005).

O TNF- α , inicialmente descoberto devido à sua atividade antitumoral, é um dos maiores mediadores da inflamação. Induzido por uma variada gama de estímulos patogênicos, essa citocina induz outros mediadores inflamatórios e proteases que orquestram a resposta inflamatória. O TNF- α também é produzido pelos tumores e pode atuar como um promotor tumoral endógeno. Essa citocina está relacionada às etapas da tumorigênese, incluindo a transformação celular, a proliferação, a invasão, a angiogênese e a metástase (SETHI et al., 2008). Hoje, é largamente aceito que o TNF- α , é um fator angiogênico que indiretamente estimula a angiogênese através do recrutamento e ativação de macrófagos (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; NALDINI; CARRARO, 2005). O tratamento com anticorpos anti-TNF- α resultou na inibição da produção de outras citocinas e quimiocinas, na redução da angiogênese e na prevenção da infiltração leucocitária, sugerindo que estas ações podem ser úteis na terapia biológica contra o câncer (NALDINI; CARRARO, 2005).

Está claro que outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β se comportam como reguladores positivos da angiogênese principalmente sobre as CE, exercendo seus efeitos diretamente, estimulando a proliferação, e indiretamente através da ação sobre fatores pró-angiogênicos liberados pelas células inflamatórias (NALDINI; CARRARO, 2005).

Como a presença das citocinas pró-inflamatórias no microambiente tumoral tem sido associada à angiogênese, acredita-se que a fração acetato de etila de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02 e os compostos puros afzelina e pteroginidina possuam um papel especial nesse contexto, uma vez que esses compostos inibem

simultaneamente a produção da citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e as diversas etapas da angiogênese.

Para finalizar os estudos de angiogênese utilizando-se células HUVEC, foi ainda avaliado o possível mecanismo de ação através do qual estariam agindo os compostos estudados que exibiram alta atividade antiangiogênica. Desse modo, foi analisado se o fator de transcrição NFκB poderia estar sendo inibido pela fração acetato de etila de *A. glandulosa* e também pelo alcalóide isolado pteroginidina, compostos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios de angiogênese. O NFκB é um fator de transcrição capaz de ativar a expressão de genes inflamatórios e antiapoptóticos, dois processos que estão associados à angiogênese (SOARES; AZEVEDO, 2007). Além disso, muitas células tumorais mostram uma ativação anômala ou constitutiva do NFκB que interfere na resistência à quimioterapia e radioterapia (LEE et al., 2007). Devido a esse papel crítico do NFκB na carcinogênese, inibidores específicos deste fator poderiam ser úteis na terapia do câncer. Pesquisas indicam que agentes capazes de prevenir o câncer ou a inflamação também puderam suprimir a ativação do NFκB, sendo que numerosas plantas e compostos puros obtidos delas são potentes inibidores desse fator de transcrição (ICHIKAWA et al., 2007).

Neste trabalho, a fração acetato de etila de *A. glandulosa* e também o alcalóide pteroginidina inibiram a atividade do NFκB nas CE (Figure 28). Vários fitoquímicos quimiopreventivos mostraram regular negativamente a expressão do NFκB (TOSETTI et al., 2002; NOONAN et al., 2007). A cúrcuma é um fitoquímico que possui propriedades antiangiogênicas. Ela é capaz de diminuir a migração e a invasão das CE e também inibir o NFκB e a IκB quinase, suprimindo assim a proliferação e a indução da apoptose (SINGH; KHAR, 2006). Além disso, Soares e Azevedo (2007) acreditam que os efeitos antiinflamatórios dos polifenóis são mediados pelo decréscimo da

expressão do gene do NFκB, conduzindo, conseqüentemente, à prevenção da angiogênese. Portanto, apesar de futuros estudos ainda serem necessários, a inativação do NFκB pela fração e pelo alcalóide é um dos mecanismos de ação através do qual os compostos exercem seus efeitos nas células HUVEC.

Freqüentemente, tem sido relatado que muitos produtos naturais podem agir como inibidores da angiogênese (LOBODA et al., 2005; NEAL et al., 2006). A sanguinarina, um alcalóide isolado das raízes da *Sanguinaria canadensis*, e os alcalóides da vinca obtidos da *Catharanthus roseus* apresentam-se como novos produtos naturais antiangiogênicos (BASINI et al., 2007; EUN; KOH, 2004; KRUCZYNSKI et al., 2006; RIBATTI et al., 2003). Além disso, a halofuginona, um alcalóide extraído da planta *Dichroa febrifuga*, é considerado um potente inibidor da angiogênese (ELKIN et al., 2000).

Flavopiridol, um flavonóide sintético, foi capaz de inibir as quinases dependentes de ciclina, induzir a apoptose, suprimir a inflamação, modular a resposta imunológica e inibir o processo angiogênico. Este é o primeiro flavonóide com esse tipo de ação que foi avaliado em ensaios clínicos com bons resultados (NEWCOMB, 2004; SENDEROWICZ, 1999; TAKADA; AGGARWAL, 2004).

Mojzis et al. (2008) descreveram pela primeira vez os potenciais efeitos antitumorais da Flavin7®, um suplemento nutricional utilizado por pacientes com câncer na Europa Central durante a quimioterapia e a radioterapia. Esse suplemento é derivado do extrato concentrado de sete frutas e seus compostos ativos são flavonóides (quercetina, kaempferol, crisina, rutina, catequina, galangina, apigenina e luteolina) e o resveratrol. Flavin7® significativamente suprimiu algumas das etapas básicas do processo de angiogênese como a migração e a formação de estruturas capilares em

células HUVEC. Os autores acreditam que alguns dos constituintes da Flavin7®, independentemente ou combinados, possam afetar o processo de neovascularização.

Atualmente, o estudo de compostos derivados de fungos endofíticos também tem tido como alvo a angiogênese. Do mesmo modo que o extrato de fungos endofítico ALG-02, a beauvericina, um composto isolado do extrato acetato de etila obtido do fungo endofítico *Fusarium oxyporum* presente na planta *Ephedra fasciculata*, demonstrou claramente uma potente atividade antiangiogênica ao inibir a formação de estruturas tipo capilares (ZHAN et al., 2007).

Esta é a primeira pesquisa que mostra os efeitos da fração acetato de etila de *A. glandulosa*, do extrato de fungo endofítico ALG-02, do alcalóide pteroginidina e do flavonóide afzelina na angiogênese utilizando células HUVEC. Mojzis et al. (2008) acreditam que os inibidores da angiogênese irão mudar a expressão da medicina na próxima década e, particularmente, os agentes quimiopreventivos que agem na biologia altamente especializada das CE durante a neovascularização merecem atenção especial.

Portanto, neste trabalho, a reunião de todos os ensaios realizados com as células HUVEC representa os eventos seqüenciais do processo angiogênico. Os efeitos antiangiogênicos dos compostos estudados se devem à inibição da proliferação, invasão e formação de estruturas tipo capilares, juntamente com a indução da apoptose. Esta pesquisa também identificou o modo de ação da fração e do alcalóide, através da inibição do NFκB. Sendo assim, os resultados demonstraram que os compostos estudados são novos inibidores da angiogênese. Conseqüentemente, esses compostos podem ser importantes no desenvolvimento de novos medicamentos benéficos em doenças dependentes de angiogênese, especialmente na prevenção e no tratamento do câncer.

Durante esta pesquisa foi realizada uma série de experimentos *in vitro* para avaliar as atividades biológicas dos compostos obtidos da planta *A. glandulosa* e dos fungos endofíticos relacionados a ela. Restava avaliar se esses compostos seriam capazes de inibir o crescimento tumoral *in vivo*. Os resultados demonstraram que a fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e o extrato do fungo endofítico ALG-02 podem fortemente inibir o crescimento tumoral tanto de tumores de mama tipo LM2 quanto os de pulmão do tipo LP07. Já o extrato do fungo endofítico ALG-03 é capaz de inibir intensamente o crescimento tumoral induzido pelas células LP07. Esse é um importante resultado que comprova a capacidade antitumoral desses compostos uma vez que eles inibem células tumorais não somente *in vitro*, mas também *in vivo*.

De modo semelhante a este trabalho, Beuth et al. (2006) estudaram os efeitos de extratos padronizados da planta *Viscum album* em linhagens celulares de carcinoma de mama humano BT474. Após injeção intratumoral dos extratos ocorreu uma significativa redução no peso dos tumores. Além disso, foi observado um decréscimo na taxa de proliferação celular e um aumento da taxa de necrose e apoptose quando os grupos de animais tratados foram comparados com o grupo controle e avaliados através da detecção dos antígenos Ki-67 e de DNA monofilamentado (ssDNA), respectivamente. Os autores acreditam que esses extratos, ao interferirem com as funções da célula tumoral, seriam úteis no tratamento do câncer de mama localizado.

Após injeção intratumoral, Gao et al. (1993) também comprovaram a capacidade antitumoral do óleo de alho. Os resultados mostraram que o óleo de alho pôde induzir o aparecimento de neutrófilos, linfócitos e macrófagos em grandes quantidades, sendo que essas células poderiam ajudar no combate ao tumor.

Grande atenção tem sido dada à possibilidade de utilização de agentes quimiopreventivos em pessoas com alto risco de desenvolvimento neoplásico. Estudos recentes indicam que o mecanismo de ação desses agentes com potencial quimiopreventivo pode ser uma combinação de efeitos antioxidante, antiinflamatório, imunoestimulante e anti-hormonal com modificações nas enzimas metabolizantes de fármacos, influência no ciclo e diferenciação celular, indução da apoptose e supressão da proliferação e angiogênese (TSUDA et al., 2004). Dessa foram, os resultados desse trabalho são muito importantes, pois os compostos estudados exibiram uma ou mais atividades biológicas e a combinação dessas atividades pode ser extremamente significativa para o potencial terapêutico da planta *A. glandulosa*.

Ultimamente, já se tem conhecimento de que, mesmo em extratos brutos de plantas, componentes ativos podem contribuir para a ação farmacológica e que substâncias puras isoladas podem produzir efeitos farmacológicos significativamente diferentes (CHANG, 2000). Neste trabalho, todos os compostos isolados da planta *A. glandulosa* apresentaram atividades biológicas diversas e em diferentes graus. Contudo, os excelentes resultados observados com a fração acetato de etila de *A. glandulosa*, demonstram a relevância do sinergismo dos compostos presentes nessa fração.

Muitas questões ainda permanecem sobre a razão pela qual tanto os compostos obtidos da planta quanto os extratos de fungos endofíticos demonstram possuir as mesmas atividades biológicas. Alguns autores acreditam que plantas têm seu uso medicinal influenciado pelos metabólitos dos seus endófitos. Por exemplo, a seiva da planta *Kennedia nigricans* tem sido tradicionalmente utilizada pelos aborígenes australianos como medicamento na cura de feridas e infecções há vários anos. Contudo, foi descoberto que a planta contém o endófito *Streptomyces* sp. NRRL 30562 que produz um novo peptídeo antibiótico de amplo-espectro chamado munumbicina.

Segundo os autores, é razoável assumir que o processo de cura descoberto pelos aborígenes pode ter sido facilitado pelos compostos produzidos por um ou mais endófitos específicos associados à planta, bem como por produtos da própria planta (STROBEL, DAISY, 2003).

A grande diversidade de plantas e microrganismos com potencial terapêutico presente nos ecossistemas brasileiros, em destaque para os da Mata Atlântica e Cerrado, fornece material para estudos especializados na procura de novos medicamentos para diferentes patologias, dentre elas as inflamações e o câncer. Assim, é sempre interessante ressaltar que microrganismos produtores de fármacos, como os fungos endofíticos, tornam possível a obtenção de compostos antes apenas gerados em pequenas quantidades pelas plantas. Os fungos endofíticos têm grande importância do ponto de vista da preservação da biodiversidade brasileira, pois garantem, concomitantemente, a produção de fármacos em grandes escalas comerciais e a preservação de espécies de plantas ameaças de extinção.

Pode-se dizer ainda que esta pesquisa possibilitou o estudo dos mecanismos pelos quais os compostos testados inibem a inflamação e a progressão tumoral, aperfeiçoando os efeitos terapêuticos da planta *A. glandulosa*. Através de uma análise geral de todos os resultados, observou-se que todos os compostos testados exibem atividades biológicas, sejam elas, antiinflamatórias, antitumorais ou antiangiogênicas. A fração de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02, o alcalóide pteroginidina e o flavonóide afzelina demonstram simultaneamente essas três atividades biológicas e apresentam potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais direcionados ao processo inflamatório e angiogênico. Além disso, esse estudo proporcionou uma melhor compreensão das ações farmacológicas da *A.*

glandulosa, ressaltando a importância da biodiversidade e também contribuindo para o entendimento da relação entre fungos endofíticos e plantas medicinais.

VII – CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se concluir que:

✓ Nenhum composto obtido da planta *A. glandulosa* e também dos fungos endofíticos foi capaz de induzir a produção de NO e das citocinas citocina pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 em culturas de macrófagos não estimuladas por LPS.

✓ Em culturas de macrófagos estimuladas por LPS, todos os compostos obtidos da planta *A. glandulosa* e também dos fungos endofíticos demonstraram atividade antiinflamatória ao inibirem significativamente a produção do mediador inflamatório NO e das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 de maneira dose-dependente e em diferentes níveis, sem causar citotoxicidade.

✓ O extrato de fungo endofítico ALG-02 apresentou o maior potencial antiinflamatório desta pesquisa, inibindo, aproximadamente, 100% da produção de NO, 98,71% da produção de TNF- α , 89,39% da produção de IL-1 β , 99,74% da produção de IL-6 e ainda 86,79% da produção de IL-12.

✓ O ácido gálico (IC₅₀=5,48 μ g/mL), o extrato de fungo endofítico ALG-03 (IC₅₀=9,37 μ g/mL) e a pteroginidina (IC₅₀=18,66 μ g/mL) foram fortemente citotóxicos às células tumorais de adenocarcinoma de mama (LM2). Enquanto que a afzelina (IC₅₀=2,31 μ g/mL), o ácido gálico (IC₅₀= 3,35 μ g/mL), o extrato de fungo endofítico ALG-02 (IC₅₀=7,87 μ g/mL) e a fração acetato de etila de *A. glandulosa* (IC₅₀=10,15 μ g/mL), demonstraram possuir uma potente atividade citotóxica em relação às células de adenocarcinoma de pulmão (LP07).

- ✓ A fração acetato de etila de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02 e os compostos puros afzelina e pteroginidina inibiram a proliferação das células HUVEC, sendo que o alcalóide pteroginidina mostrou uma drástica redução da proliferação das células endoteliais, cerca de 8 vezes menor que o controle.

- ✓ A fração acetato de etila de *A. glandulosa* e o alcalóide pteroginidina causaram um grande aumento na taxa de apoptose das células HUVEC, aproximadamente 19 e 14 vezes o valor do controle, respectivamente.

- ✓ Ocorreu um grande decréscimo na capacidade invasiva das células HUVEC tratadas com a fração acetato de etila de *A. glandulosa*, com o extrato de fungo endofítico ALG-02 e com os compostos afzelina e pteroginidina, sendo que a fração e o alcalóide pteroginidina causaram uma inibição, aproximadamente, 7 e 24 vezes maior do que o controle.

- ✓ A fração acetato de etila de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02, a afzelina e a pteroginidina foram capazes de prevenir a formação de estruturas tipo capilares em matrigel. A fração, o extrato ALG-02 e a pteroginidina reduziram drasticamente o número dessas estruturas, indicando que esses compostos podem fortemente interromper a formação dos vasos.

- ✓ A fração acetato de etila de *A. glandulosa* e também o alcalóide pteroginidina inibiram a atividade do NFκB nas células endoteliais.

✓ Nos ensaios *in vitro* que simulam as etapas da angiogênese, a fração acetato de etila de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02 e os compostos puros afzelina e pteroginidina demonstraram atividade antiangiogênica em diferentes graus, sendo a fração e o alcalóide os compostos mais promissores.

✓ *In vivo*, a fração acetato de etila da planta *A. glandulosa* e o extrato do fungo endofítico ALG-02 podem fortemente inibir o crescimento tumoral tanto de tumores de mama tipo LM2 quanto de tumores de pulmão do tipo LP07. Além disso, o extrato do fungo endofítico ALG-03 também é capaz de inibir intensamente o crescimento tumoral *in vivo* induzido pelas células LP07.

✓ Tanto os compostos obtidos da planta quanto os extratos de fungos endofíticos exibem atividades biológicas, sejam elas, antiinflamatórias, antitumorais ou antiangiogênicas. A fração de *A. glandulosa*, o extrato de fungo endofítico ALG-02, o alcalóide pteroginidina e o flavonóide afzelina demonstram simultaneamente essas três atividades biológicas e apresentam potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais direcionados ao processo inflamatório e angiogênico.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S. S.; SINGH, V. K. Immunomodulators: a review of studies on Indian medicinal plants and synthetic peptides: Part I. Medicinal plants. **Proc. Indian Natl. Sci. Acad. B.**, New Delhi, v. 65, p.179-204, 1999.

AHMAD, S.; ISRAF, D.A.; LAJIS, N.H.; SHAARI, K.; MOHAMED, H.; WAHAB, A.A.; ARIFFIN, K.T.; HOO, W.Y.; AZIZ, N.A.; KADIR, A.A.; SULAIMAN, M.R.; SOMCHIT, M.N. Cardamonin, inhibits pro-inflammatory mediators in activated RAW 264.7 cells and whole blood. **Eur. J. Pharmacol.**, v.538, n.1-3, p.188-194, 2006.

AMMAR, R.B.; KILANI, S.; BOUHLEL, I.; EZZI, L.; SKANDRANI, I.; BOUBAKER, J.; SGHAIER, M.B.; NAFFETI, A.; MAHMOUD, A.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K. Antiproliferative, antioxidant, and antimutagenic activities of flavonoid-enriched extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: combination with the phytochemical composition. **Drug Chem. Toxicol.**, v.31, n.1, p.61-80, 2008.

ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer, 1991. 499p.

ARNOLD, A.E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n.3, p. 541-549, 2007.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet.**, v. 357, n. 9255, p.539-545, 2001.

BASHYAL, B.P.; WIJERATNE, E.M.; FAETH, S.H.; GUNATILAKA, A.A. Globosumones A-C, cytotoxic orsellinic acid esters from the Sonoran desert endophytic fungus *Chaetomium globosum*. **J Nat Prod.**, v.68, n.5, p.724-728, 2005.

BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; SANTINI, S.E.; GRASSELLI, F. Sanguinarine inhibits VEGF-induced angiogenesis in a fibrin gel matrix. **Biofactors**, v.29, p.11-18, 2007.

BATRA, J.; CHATTERJEE, R.; GHOSH, B. Inducible nitric oxide synthase (iNOS): role in asthma pathogenesis. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v.44, n.5, p.303-309, 2007.

BENELLI, R.; LORUSSO, G.; ALBINI, A.; NOONAN, D.M. Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. **Curr. Pharm. Des.**, Schiphol, v.12, n.24, p.3101-3115, 2006.

BEUTH, J.; KO, H.L.; SCHNEIDER, H.; TAWADROS, S.; KASPER, H.U.; ZIMST, H.; SCHIERHOLZ, J.M. Intratumoral application of standardized mistletoe extracts down regulates tumor weight via decreased cell proliferation, increased apoptosis and necrosis in a murine model. **Anticancer Res.**, v.26, n.6B, p.4451-4456, 2006.

BILLS, G.; DOMBROWSKI, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J.; NA, Z. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In: WATLING, R.; FRANKLAND, J.C.; AINSWORTH, A.M.; ISSAC, S.; ROBINSON, C.H. **Tropical mycology: micromycetes**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 165-194.

BOLZANI, V.S.; GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.**, v.58, p.1683-1688, 1995.

BOONMAN, N.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; DHARMKRONG, A.T.; CHUSATTAYANOND, A. Acanthamoebicidal activity of *Fusarium* sp. Tlau3, an endophytic fungus from *Thunbergia laurifolia* Lindl. **Parasitol Res.**, v.103, n.5, p.1083-1090, 2008.

BOUAICHA, N.; AMADE, P.; PUEL, D.; ROUSSAKIS, C. Zarzissine, a new cytotoxic guanidine alkaloid from the Mediterranean sponge *Anchinoe paupertas*. **Nat. Prod.**, v.57, p.1455-1457, 1994.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & molecular biology of plants. In: CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. **Natural products (secondary metabolites)**. New York: Wiley-Liss, 2002. p. 1250-1318.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, vol.55, n.3, p.37-39, 2003.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Cienc. Hoje**, São Paulo, v.21, n.123, 1996.

CALVO, T.R.; LIMA, Z.P.; SILVA, J.S.; BALLESTEROS, K.V.; PELLIZZON, C.H.; HIRUMA-LIMA, C.A.; TAMASHIRO, J.; BRITO, A.R.; TAKAHIRA, R.K.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol. Pharm. Bull.**, v.30, n.3, p.451-459, 2007.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, London, v. 407, p. 249-257, 2000.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais e potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 640p.

CASALE, T. B.; COSTA, J. J.; GALLI, S. J. TNF- α is important in human lung allergic reactions. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, New York, v.15, n.1, p. 35-44, 1996.

CHANG, J. Medicinal herbs: drugs or dietary supplements. **Biochem. Pharmacol.**, v.59, p. 211–219, 2000.

CHANG, L.; WHITTAKER, N.F.; BEWLEY, C.A. Crambescidin 826 and dehydrocrambine A: new polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora* sp that inhibit HIV-1 fusion. **J. Nat. Prod.**, v.66, p.1490-1494, 2003.

CHENG, A.C.; JIAN, C.B.; HUANG, Y.T.; LAI, C.S.; HSU, P.C.; PAN, M.H. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, p. 2206-2218, 2007.

CHENG, Z.J.; LIN, C.N.; HWANG, T.L.; TENG, C.M. Broussonchalcone A, a potent antioxidant and effective suppressor of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-activated macrophages. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, p. 939–946, 2001.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E2 and cytokines in RAW264.7 macrophages. **Fitoterapia**, v.76, n.7-8, p.608-613, 2005.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p.829-837, 2004.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M.H.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Quim. Nova**, São Paulo, v.26, n.6, p.825-827, 2003.

COSTA, C.; INCIO, J.; SOARES, R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? **Angiogenesis**, v.10, p.149-166, 2007.

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

CRAGG, G. M.; BOYD, M. R.; CARDELLINA, J. H.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M.; McCLOUD, T. G. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. **Ciba Found Symp.**, Amsterdam, v.185, p.178-190, 1994.

DELAPORTE, E. Immune-mediated inflammatory diseases and psoriasis. **Ann Dermatol. Venereol.**, v. 135, n. 4, p. S269-274, 2008.

DINARELLO, C.A.; GELFAND, J.A.; WOLFF, S.M. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. **Jama**, Chicago, v.269, n.14, p.1829-35, 1993.

DINERMAN, J. L.; LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H. Molecular mechanisms of nitric oxide production. Potential relevance to cardiovascular disease. **Circ. Res.**, Baltimore, v.73, p.217-222, 1993.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Unesp, 1995. 230p.

DOS SANTOS, P. A.; AMARANTE, M. F.; PEREIRA, A. M.; BERTONI, B.; FRANCA, S. C.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PEREIRA, M. R.; LOPES, N. P. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 52, n.12, p.1433-1435, 2004.

DREYFUSS, M.M.; CHAPELA, I.H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. **Biotechnology**, v. 26, p.49-80, 1994.

DUPERRON, C.; CASTONGUAY, A. Chemopreventive efficacies of aspirin and sulindac against lung tumorigenesis in A/J mice. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 18, n. 5, p.1001–1006, 1997.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol. Today**, Cambridge, v.18, n.10, p.487-492, 1997.

ELIZABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.51, p.110-120, 1996.

ELKIN, M.; MIAO, H.Q.; NAGLER, A.; AINGORN, E.; REICH, R.; HEMO, I.; DOU, H.L.; PINES, M.; VLODAVSKY, I. Halofuginone: a potent inhibitor of critical steps in angiogenesis progression. **FASEB J.**, v.14, p.2477-2485, 2000.

EL SAYED, K.A. Natural products as angiogenesis modulators. **Mini Rev. Med. Chem.**, v.5, p.971-993, 2005.

ESKEW, M. L.; ZARKOWER, A.; SCHEUCHENZUBER, W. J. Effects of inadequate vitamin E and/or selenium nutrition on the release of arachidonic acid metabolites in rat alveolar macrophages. **Prostaglandins**, v.38, p.79-89, 1989.

ESPOSITO E, CUZZOCREA S. The role of nitric oxide synthases in lung inflammation. **Curr. Opin. Investig Drugs.**, v.8, n.11, p.899-909, 2007.

EUN, J.P.; KOH, G.Y. Suppression of angiogenesis by the plant alkaloid, sanguinarine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.317, p.618-624, 2004.

FARIED, A.; KURNIA, D.; FARIED, L.S.; USMAN, N.; MIYAZAKI, T.; KATO, H.; KUWANO, H. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. **Int. J. Oncol.**, v. 30, n. 3, p. 605-613, 2007.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v.14, p.397-440, 1996.

FETROW, C.W.; AVILA, J.R. **Manual de medicina alternativa para o profissional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 743p.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med.** New York, v.1, n.1, p. 27-31, 1995.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxicol.**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** New York: Wiley-Liss, 1994. 486p.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K.D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? **Biodivers. Conserv.**, v. 8, p. 977–1004, 1999.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

GANJU, L.; KARAN, D.; CHANDA, S; SRIVASTAVA, K. K; SAWHNEY, R. C.; SELVAMURTHY, W. Immunomodulatory effects of agents of plant origin. **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v.57, p.296–300, 2003.

GAO, Y. M.; XIE, J. Y.; PIAO, Y. J. Ultrastructural observation of intratumoral neutrophils and macrophages induced by garlic oil. **Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.**, v.13, n.9, p.546-8, 518, 1993.

GATELY, S.; LI, W.W. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. **Semin. Oncol.**, v.31, p.2-11, 2004.

GENG, Y.; ZHANG, B.; LOTZ, M. Protein tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. **J. Immunol.**, v. 151, p.6692-6700, 1993.

GIBSON, P. R. Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF the link? **Gut**, London, v.53, n.12, p.1724-1725, 2004.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clin. Transl. Oncol.**, v.9, p.767-776, 2007.

GRAHAM, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Prev. Med.**, v. 21, p. 334-350, 1992.

GREEN, L .C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytic. Biochem.**, New York, v.126, n.1 p.131-138, 1982.

GRUNDHÖFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G.G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57, n.6, p. 915-927, 2001.

GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; KAWANO, C.Y.; RIBEIRO, P.H.; GOLDMAN, G.H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.52, n.1, p. 134-144, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, London, v.219, p.1-14, 1984.

HALLMANN, J.; QUADT – HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov. Today**, v.13, n.19-20, p.894-901, 2008.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revised. **Mycol. Res.**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

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

HUANG, Y.C., GUH, J.H., CHENG, Z.J., CHANG, Y.L., HWANG, T.L., LIN, C.N., TENG, C.M. Inhibitory effect of DCDC on lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis in RAW 264.7 cells. **Life Sci.**, v. 68, p. 2435–2447, 2001.

HUANG, Y.J.; WANG, J.F.; LI, G.L.; ZHENG, Z.H.; SU, W.J. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.31, p.163–167, 2001.

IALENTI, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.110, n.2, p.701-706, 1993.

ICHIKAWA, H.; NAKAMURA, Y.; KASHIWADA, Y.; AGGARWAL, B.B. 2007. Anticancer drugs designed by mother nature: ancient drugs but modern targets. *Curr Pharm Des* 13:3400-3416, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2
Acesso: agosto de 2008.

INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER. **About cancer**. Disponível em: http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=113
Acesso: agosto de 2008.

JAGAN, S.; RAMAKRISHNAN, G.; ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; DEVAKI, T. Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 319, n.1-2, p.51-59, 2008.

JANG, S.I.; JEONG, S.I.; KIM, K.J.; KIM, H.J.; YU, H.H.; PARK, R.; KIM, H.M.; YOU, Y.O. Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* inhibits inducible nitric oxide synthase expression and production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in activated RAW 264.7 cells. *Planta Med.*, v. 69, n. 11, p.1057-1059, 2003.

KANDA, T.; TAKAHASHI, T. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Jpn. Heart J.*, v.45, n.2, p.183-193, 2004.

KANDASWAMI, C.; LEE, L.T.; LEE, P.P.; HWANG, J.J.; KE, F.C.; HUANG, Y.T.; LEE, M.T. The antitumor activities of flavonoids. **In Vivo**, v. 19, n. 5, p. 895-909, 2005.

KANG, B.Y.; CHUNG, S.W.; KIM, T.S. Inhibition of interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages by hypericin, an active component of *Hypericum perforatum*. **Planta Med.**, v. 67, n. 4, p. 364-366, 2001.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; ANDERLINI, P.; TALPAZ, M. 1996. Treatment of myelogenous leukemia: current status and investigational options. **Blood**, v.87, p.3069-3081, 1996.

KARKABOUNAS, S.; ASSIMAKOPOULOS, D.; MALAMAS, M.; SKALTSOUNIS, A. L.; LEONCE, S. et al. Antiproliferative and anticarcinogenic effects of a aqueous preparation of *Abies alba* and *Viscum album* se abies, on a L-1210 malignant cell line and tumor bearing Wistar rats. **Anticancer Res.**, Athens, v.20, p.4391– 4395, 2000.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.100, n.5, p. 567-573, 1993.

KILBOUM, R. G.; GRIFFITH, O. W. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington, v.84, n.11, p.827-831, 1992.

KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

KIM, H.J.; HAWKE, N.; BALDWIN, A.S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. **Cell Death Differ.**, v.13, n.5, p.738-747, 2006.

KIM, J.H.; LEE, B.K.; LEE, K.W.; LEE, H.J. Resveratrol counteracts gallic acid-induced down-regulation of gap-junction intercellular communication. **J. Nutr. Biochem.**, 2008.

KIM, S.H.; JUN, C.D.; SUK, K.; CHOI, B.J.; LIM, H.; PARK, S.; LEE, S.H.; SHIN, H.Y.; KIM, D.K.; SHIN, T.Y. Gallic acid inhibits histamine release and pro inflammatory cytokine production in mast cells. **Toxicol. Sci.**, v. 91, n.1, p.123-131, 2006.

KINGSTON, D.G.; NEWMAN, D.J. Taxoids: cancer-fighting compounds from nature. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v.10, p.130-144, 2007.

KOK, T.W.; YUE, P.Y.; MAK, N.K.; FAN, T.P.; LIU, L.; WONG, R.N. The anti-angiogenic effect of sinomenine. **Angiogenesis**, v.8, p.3-12, 2005.

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

KROES, B. H.; VAN DEN BERG, A. J.; QUARLES VAN UFFORD, H. C.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R. P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med.**, v. 58, p. 499-504, 1992.

KROL, W.; CZUBA, Z.P.; THREADGILL, M.D.; CUNNINGHAM, B.D.; PIETSE, G. Inhibition of nitric oxide (NO) production in murine macrophages by flavones. **Biochem. Pharmacol.**, v. 50, p.1031-1035, 1995.

KRUCZYNSKI, A.; POLI, M.; DOSSI, R.; CHAZOTTES, E.; BERRICHON, G.; RICOME, C.; GIAVAZZI, R.; HILL, B.T.; TARABOLETTI, G. Anti-angiogenic, vascular-disrupting and anti-metastatic activities of vinflunine, the latest vinca alkaloid in clinical development. **Eur. J. Cancer**, v.42, p.2821-2832, 2006.

KUMAR, D.S.; LAU, C.S.; WAN, J.M.; YANG, D.; HYDE, K.D. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothës*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. **Life Sci.**, v. 78, n. 2, p. 147-156, 2005.

KUTCHAN, T.M. Alkaloid biosynthesis [mdash] the Basis for metabolic engineering of medicinal plants. **Plant Cell.**, v.7, p.1059-1070, 1995.

LEE, A.K.; SUNG, S.H.; KIM, Y.C.; KIM, S.G. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I-kappaB α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, p. 11–20, 2003.

LEE, C.H.; JEON, Y.T.; KIM, S.H.; SONG, Y.S. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. **Biofactors**, v.29, p.19-35, 2007.

LEE, J.; LOBKOVSKY, E.; PLIAM, N.B.; STROBEL, G. A.; CLARDY, J. Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. **J. Org. Chem.** 60:7076–7077, 1995.

LISTA DE ÁRVORES NATIVAS DO BRASIL. CEPEN. **Centro de Pesquisas Ecológicas e Ambientais**. Disponível em: http://www.cepen.com.br/arvore_nat_list.htm#A%20Lista
Acesso em: 14 jun. 2004.

LIU, J.J.; HUANG, R.W.; LIN, D.J.; PENG, J.; WU, X.Y.; PAN, X.L.; LI, M.Q.; LIN, Q. Anti-proliferative effects of oridonin on SPC-A-1 cells and its mechanism of action. **Int. Med. Res.**, v.32, n.6, p.:617-625, 2004.

LOBODA, A.; CISOWSKI, J.; ZAREBSKI, A.; JAZWA, A.; RIVIERA NUNEZ, D.; KYPRIOTAKIS, Z.; HEINRICH, M.; DULAK, J. Effects of plant extracts on angiogenic activities of endothelial cells and keratinocytes. **J. Physiol. Pharmacol.**, Krakow, v.56, n.1, p.125-137, 2005.

LODGE, D.J.; FISHER, P.J.; SUTTON, B.C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, v. 88, p. 733–738, 1996.

LOPES, F.C.M., 2004. Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea* spp quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos murinos, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 146p.

LOPES, F.C.M.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I.Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF- α production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.28, n.9, p.1726-1730, 2005.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas e árvores nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Mol. Cancer Res.**, v.4, n.4, p.221-233. 2006.

MacMICKING, J.; QIAO-WEN XIE; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v.15, p.323–350,1997.

MAHESHWARI, R.K.; SINGH, A.K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R.C. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life Sci.**, v.78, n.18, p.2081-2087, 2006.

MANJEET, K. R.; GHOSH, B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. **Int. J. Immunopharmacol.**, Oxford, v.21, p.435-443, 1999.

MARNETT, L. J. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. **Cancer Res**, Baltimore, v. 52, n. 20, p. 5575-5589, 1992.

MARX, J. Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. **Science**, Washington, v.306, n.5698, p.966-968, 2004.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. **Bioorg Med Chem.**, v. 11, n.9, p. 1995-2000, 2003.

MAVAR-MANGA, H.; CHAPON, D.; HOET, S.; BLOCK, S.; PAUW-GILLET, M.C.; QUETIN-LECLERCQ, J. N1,N2,N3-trisisopentenyl guanidine and N1,N2-diisopentenyl guanidine, two cytotoxic alkaloids from *Alchornea cordifolia* (Schumach.& Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) root barks. **Nat. Prod. Commun.**, v.1, p.1097-1100, 2006.

MAVAR-MANGA, H.; HADDAD, M.; PIETERS, L.; BACCELLI, C.; PENGE, A.; QUETIN-LECLERCQ, J. Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. **J. Ethnopharmacol.**, v.115, p.25-29, 2008.

MEDICAL NEWS TODAY. **Cancer cases up but survival more than doubles in breast and bowel cancer.** Disponível em:

<http://www.medicalnewstoday.com/articles/114037.php>. Acesso: agosto de 2008.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA, 1998. 488p.

MESKIN, M. S.; BIDLACK, W. R.; DAVIES, A. J.; LEWIS, D. S.; RANDOLPH, R. K. **Phytochemicals mechanisms of action**. Boca Raton: CRC PRESS, 2004. 203p.

MIDDLETON JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev.**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial. 2000. 116p.

MILLER, K.D.; SWEENEY, C.J.; SLEDGE JR, G.W. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics. **J. Clin. Oncol.**, v.19, p.1195-1206, 2001.

MOHAN, R.; HAMMERS, H.J.; BARGAGNA-MOHAN, P.; ZHAN, X.H.; HERBSTTRITT, C.J.; RUIZ, A.; ZHANG, L.; HANSON, A.D.; CONNER, B.P.; ROUGAS, J.; PRIBLUDA, V.S. Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis. **Angiogenesis**, v.7, n.2, p.115-122, 2004.

MOJZIS, J.; SARISSKÝ, M.; PILÁTOVÁ, M.; VOHAROVÁ, V.; VARINSKÁ, L.; MOJZISOVÁ, G.; OSTRO, A.; URDZÍK, P.; DANKOVCIK, R.; MIROSSAY, L. *In vitro* antiproliferative and antiangiogenic effects of Flavin7®. **Physiol. Res.**, v. 57, n. 3, p.413-420, 2008.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MOONGKARNDI, P.; KOSEM, N.; LUANRATANA, O.; JONGSOMBOONKUSOL, S.; PONGPAN, N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. **Fitoterapia**, Milano, v. 75, n.3-4, p.375-377, 2004.

MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; ZICHE, M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. **Curr. Pharm. Des.**, Schiphol, v.9, n.7, p.521-530, 2003.

MORELAND, LW. Inhibitors of tumor necrosis factor for rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 5, p.7-15, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.

MULLER, K.; HERNER, E. B.; STAGG, A.; BENDTZEN, K.; WOO, P. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, Oxford, v. 37, n. 5, p.562-569, 1998.

MYERS, N.; MILTTERMEIER, R. A.; MILTTERMEIER, C. G.; FONSECA, G.A.B.; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v, 403, n. 24, p.853-858, 2000.

NALDINI, A., CARRARO, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.*, Hilversum, v. 4, n.1, p.3-8, 2005.

NEAL, C.P.; BERRY, D.P.; DOUCAS, H.; MANSON, M.M.; STEWARD, W.; GARCEA, G. Clinical aspects of natural anti-angiogenic drugs. **Curr. Drug Targets**, v.7, p.371-383, 2006.

NEUHOUSER, M.L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutr. Cancer.**, v.50, n.1, p.1-7, 2004.

NEWCOMB, E.W. Flavopiridol: pleiotropic biological effects enhance its anti-cancer activity. **Anticancer Drugs.**, v.15, n.5, p. 411-419, 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 3, p. 461- 477, 2007.

NOONAN, D.M.; BENELLI, R.; ALBINI, A. Angiogenesis and cancer prevention: a vision. **Recent Results Cancer Res.**, v.174, p.219-224, 2007.

NOR, J.E.; POLVERINI, P.J. Role of endothelial cell survival and death signals in angiogenesis. **Angiogenesis**, v.3, p.101–116, 1999.

OBERLIES, N.H.; KROLL, D. J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v. 67, n.2, p.129-135, 2004.

ONO, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Sci.**, v.99, n.8, p.1501-1506, 2008.

OPOKU, A. R.; GEHEEB-KELLER, M.; LIN J.; TERBLANCHE, S. E.; HUTCHINGS, A. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for antineoplastic activities versus the HepG2 cell line. **Phytother. Res.**, London, v.14, p.534– 537, 2000.

OPPENHEIM, J. J.; RUSCETTI, F. W.; FALTYNEK, C. R. Cytokines. In: STITES, D.P.; STOBO, J.D.; WELLS, J.V. **Basic clinical immunology**. Connecticut: Appleton & Lange, 1994. cap.9, p.105-123.

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

PANDYA, N.M.; DHALLA, N.S.; SANTANI, D.D. Angiogenesis - a new target for future therapy. **Vascul Pharmacol.**, v. 44, n.5, p. 265-274, 2006.

PAPANICOLAOU, D. A.; WILDER, R. L.; MANOLAGAS, S. C.; CHROUSOS, G. P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. **Ann Intern Med.**, Philadelphia, v.128, n.2, p.127-137, 1998.

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

PATIL, R.R.; GUHAGARKAR, S.A.; DEVARAJAN, P.V. Engineered nanocarriers of doxorubicin: a current update. **Crit. Ver. Ther. Drug Carrier Syst.**, v.25, n.1, p.1-61, 2008.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Med.**, Stuttgart, v.69, p.491-495, 2003.

PILARSKI, R.; POCZEKAJ-KOSTRZEWSKA, M.; CIESIOŁKA, D.; SZYFTER, K.; GULEWICZ, K. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Pharmacol. Rep.**, v. 59, p.565-572, 2007.

PRAT, A.; CASADO, E.; CORTÉS, J. New approaches in angiogenic targeting for colorectal cancer. **World J. Gastroenterol.**, v13, p.5857-5866, 2007.

RAINA, K.; RAJAMANICKAM, S.; DEEP, G.; SINGH, M.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Chemopreventive effects of oral gallic acid feeding on tumor growth and progression in TRAMP mice. **Mol Cancer Ther.**, v. 7, n. 5, p. 1258-1267, 2008.

RAKOTONIRIANA, E.F.; MUNAUT, F.; DECOCK, C.; RANDRIAMAMPIONONA, D.; ANDRIAMBOLOLONIAINA, M.; RAKOTOMALALA, T.; RAKOTONIRINA, E.J.; RABEMANANTSOA, C.; CHEUK, K.; RATSIMAMANGA, S.U.; MAHILLON, J.; EL-JAZIRI, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; CORBISIER, A.M. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, v.93, n.1-2, p. 27-36, 2008.

RAM, V.J.; KUMARI, S. Natural products of plant origin as anticancer agents. **Drug News Perspect.**, v.14, p.465-482, 2001.

RAO, Y.K.; FANG, S.H.; TZENG, Y.M. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 3, p. 249-253, 2005a.

RAO, Y.K.; FANG, S.H.; TZENG, Y.M. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF-alpha and IL-12 in activated macrophages. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 5, p. 912-915, 2005b.

REN, Y.; STROBEL, G.A.; GRAFF, J.C.; JUTILA, M.; PARK, S.G.; GOSH, S.; TEPLow, D.; CONDRON, M.; PANG, E.; HESS, W.M.; MOORE, E. Colutellin A, an immunosuppressive peptide from *Colletotrichum dematium*. **Microbiology**, v. 154, n.Pt 7, p.1973-1979, 2008.

RISHTON, G.M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **Am. J. Cardiol.**, v. 101, n. 10^a, p. 43D-49D, 2008.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999. 423p.

ROSMARIN, D.; STROBER, B.E. The potential of interleukin 12 inhibition in the treatment of psoriasis. **Drugs Dermatol.**, v.4, n.3, p.318-325, 2005.

SADOWSKA-KROWICKA, H.; MANNICK, E.E.; OLIVER, P.D.; SANDOVAL, M.; ZHANG, X.J.; ELOBY-CHILDESS, S.; CLARK, D.A.; MILLER, M.J. Genistein and gut inflammation: role of nitric oxide. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 217, p. 351-357, 1998.

SAGAR, S.M.; YANCE, D. WONG, R.K. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer - Part 1. **Curr. Oncol.**, v. 13, p.14-26, 2006.

SANDOVAL, M.; CHARBONNET, R. M.; OKUHAMA, N. N.; ROBERTS, J.; KRENOVA, Z.; TRENTACOSTI, A. M.; MILLER, M. J. Cat's claw inhibits TNF-alpha production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v.29, n.1, p.71-78, 2000.

SANTANGELO, C.; VARÌ, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Ann. Ist. Super Sanita.**, v.43, n.4, p.394-405, 2007.

SCHACHNA, L. The anti-TNF revolution in ankylosing spondylitis. **Med. J. Aust.**, Sydney, v.181, n.10, p.529-530, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol Res.**, v.109, n.Pt 6, p.661-686, 2005.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Barueri: Manole, 2002. 386p.

SENDEROWICZ, A.M. Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. **Invest. New Drugs.**, v. 17, n. 3, p. 313-320, 1999.

SEO, W. G.; PAE, H. O.; OH, G. S.; CHAI, K. Y.; YUN, Y. G.; KWON, T. O.; CHUNG, H. T. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- γ and lipopolysaccharide. **Gen. Pharmacol.**, Oxford, v.35, p.21-28, 2001.

SETHI, G.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Front Biosci.**, v.13, p.5094-5107, 2008.

SETTY, A.R.; SIGAL, L.H. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. **Semin. Arthritis Rheum.**, v.34, n.6, p.773-784, 2005.

SHARPE, C. R.; COLLET, J. P.; McNUTT, M.; BELZILE, E.; BOIVIN, J.F.; HANLEY, J. A. Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. **Br. J. Cancer**, London, v. 83, n. 1, p.112-120, 2000.

SINGH, S.; KHAR, A. Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v.6, p.259-270, 2006.

SMITH, S.A.; TANK, D.C.; BOULANGER, L.A.; BASCOM-SLACK, C.A.; EISENMAN, K.; KINGERY, D.; BABBS, B.; FENN, K.; GREENE, J.S.; HANN, B.D.; KEEHNER, J.; KELLEY-SWIFT, E.G.; KEMBAIYAN, V.; LEE, S.J.; LI, P.; LIGHT, D.Y.; LIN, E.H.; MA, C.; MOORE, E.; SCHORN, M.A.; VEKHTER, D.; NUNEZ, P.V.; STROBEL, G.A.; DONOGHUE, M.J.; STROBEL, S.A. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. **Plos One**, v.3, n.8, e3052, 2008.

SOARES, R.; AZEVEDO, I. Inhibition of S1P by polyphenols prevents inflammation and angiogenesis: NFkappaB, a downstream effector? **Free Radic. Biol. Med.**, v.42, n.2, p.311, 2007.

SOARES, R.; BALOGH, G.; GUO, S.; GARTNER, F.; RUSSO, J.; SCHMITT F. Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. **Mol. Endocrinol.**, v.18, n.9, p.2333-2343, 2004.

SONG, Y.C.; LI, H.; YE, Y.H.; SHAN, C.Y.; YANG, Y.M.; TAN, R.X. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. **FEMS Microbiol Lett.**, v.241, n.1, p.67-72, 2004.

SOREK, H.; RUDI, A.; GUETA, S.; REYES, F.; MARTIN, M.J.; AKNIN, M.; GAYDOU, E.; VACELET, J.; KASHMAN, Y. Netamines A-G: seven new tricyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei*. **Tetrahedron**, v.62, p.8838-8843, 2006.

SOUTHAN, G.J.; SZABÓ, C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem. Pharmacol.**, v.51, n.4, p.383-394, 1996.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SPELMAN, K.; BURNS, J.; NICHOLS, D.; WINTERS, N.; OTTERSBERG, S.; TENBORG, M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. **Altern. Med. Rev.**, v. 11, n. 2, p. 128-150, 2006.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, Washington, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infect.**, v.5, n.6, p.535-544, 2003.

STROBEL, G.A.; HESS, W.M.; FORD, E.; SIDHU, R.S.; YANG, X. Taxol from fungal endophyte and issue of biodiversity. **J. Ind. Microbiol.** 17, 417–423, 1996.

STROBEL, G. A.; STIERLE, A.; STIERLE, D.; HESS, W. M. *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. **Mycotaxon**, v. 47, n. 71–78, 1993.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

SUFFREDINI, A.F.; FANTUZZI, G.; BADOLATO, R.; OPPENHEIM, J.J.; O'GRADY, N.P. New insights into the biology of the acute phase response. **J. Clin. Immunol.**, v. 19, n. 4, p.203-214, 1999.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v.78, p.223-226, 2007.

SUFFREDINI, I.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Cytotoxic molecules from natural sources: tapping the Brazilian biodiversity. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v.6, p.367-375, 2006.

SUMNER, J. **The Natural History of Medicinal Plants**. Portland: Timber Press. 2000. 235p.

SURH, Y. J.; CHUN, K. S.; CHA, H.H.; HAN, S. S.; KEUM, Y. S.; PARK, K. K.; LEE, S. S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.480-481, p.243-268, 2001.

TAKADA, Y.; AGGARWAL, B.B. Flavopiridol inhibits NF- κ B activation induced by various carcinogens and inflammatory agents through inhibition of I κ B α kinase and p65 phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 4750–4759, 2004.

TAN, G.; GYLLENHAAL, C.; SOEJARTO, D.D. 2006. Biodiversity as a source of anticancer drugs. **Curr. Drug Targets**, v.7, p.265-277, 2006.

TANIMURA, S.; KADOMOTO, R.; TANAKA, T.; ZHANG, Y.J.; KOUNO, I.; KOHNO, M. Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 330, n. 4, p.1306-1313, 2005.

TAO, J.Y.; ZHAO, L.; HUANG, Z.J.; ZHANG, X.Y.; ZHANG, S.L.; ZHANG, Q.G.; FEI-XIAO; ZHANG, B.H.; FENG, Q.L.; ZHENG, G.H. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl on lps-stimulated RAW 264.7 cell. **Inflammation.**, v. 31, n. 3, p.154-166, 2008.

TOSETTI, F.; FERRARI, N.; DE FLORA, S.; ALBINI, A. Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. **FASEB J.**, v. 16, n.1, p.2-14, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of t-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. **Blood**, New York, v. 84, n. 12, p. 4008-4027, 1994.

TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. Interleukin-12: basic principles and clinical applications. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 238, p. 57-78, 1999.

TSUDA, H.; OHSHIMA, Y.; NOMOTO, H.; FUJITA, K.; MATSUDA, E.; IIGO, M.; TAKASUKA, N.; MOORE, M.A. Cancer prevention by natural compounds. **Drug. Metab. Pharmacokinet.**, Tokyo, v.19, n.4, p.245-263, 2004.

VAFEIADOU, K.; VAUZOUR, D.; SPENCER, J.P. Neuroinflammation and its modulation by flavonoids. **Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets**, v.7, n.3, p.211-224, 2007.

VAN ASSCHE, G. Emerging drugs to treat Crohn's disease. **Expert Opin. Emerg. Drugs**, v. 12, n. 1, p. 49-59, 2007.

WAGENAAR, M., CORWIN, J.; STROBEL, G. A.; CLARDY, J. Three new chytocalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochlaidiella*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p.1692–1695, 2000.

WANG, H.; LI, Y.L.; SHE, W.Z.; GUO, G.Q.; JIANG, Z.Y.; CEN, Y.Z.; FAN, Z.Y. Studies on antiproliferative effect of flavones compounds isolated from Yao herb Medicines. **Zhong Yao Cai**, v.30, n.8, p.980-984, 2007.

WANG, H.M.; ZHANG G.Y., Indomethacin suppresses growth of colon cancer via inhibition of angiogenesis *in vivo*. **World J. Gastroenterol.**,v.11, n.3, p340-343, 2005.

WARGOVICH, M. J., WOODS, C.; HOLLIS, D. M.; ZANDER, M. E. Herbals, cancer prevention and health. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 131, n. 11, p. 3034S-6S, 2001.

WEBER, D.; STERNER, O.; ANKE, T.; GORZALCZANCY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C. Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. **J. Antibiot.**, v. 57, n. 9, p.559-563, 2004.

WIJESEKERA, R.O.B. **The medicinal plant industry**. Boca Raton: CRC Press,1991. 269p.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. **Altern. Med. Rev.**, Saindpoint, v.6, n.6, p. 567-579, 2001.

WILLIAMSON, E. M.; OKPAKO, D. T.; EVANS, F. J. **Pharmacological methods in phytotherapy research: selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material**. London: John Wiley & Sons, 1996. 238p.

WILSON, D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v.73, n.2, p. 274-276, 1995.

WINTERS, M. Ancient medicine, modern use: *Withania somnifera* and its potential role in integrative oncology. **Altern. Med. Rev.**, v.11, n.4, p.269-277, 2006.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and antimalarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World J Microb Biot.**, v.20, p.265–272, 2004.

WONG, S.S; FINCH, S; DALZIEL, J.; DUNLOP, J. Novel anti-inflammatory compounds from endophyte fungus in inhibitions of cytokine responses in macrophage RAW 264.7 cells. **Clin. Immunol.**, v. 119, n. 1, p. S197, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world?** Disponível em:

<http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>. Acesso: agosto de 2008.

YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 157, n.1, p. 65-75, 2000.

YOSHIDA, M.; FUCHIGAMI, M.; NAGAO, T.; OKABE, H.; MATSUNAGA, K.; TAKATA, J.; KARUBE, Y.; TSUCHIHASHI, R.; KINJO, J.; MIHASHI, K.; FUJIOKA, T. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active

triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n.1, p.173-175, 2005.

YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v.62, p.763-768, 2007.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

ZHAN, J.; BURNS, A.M.; LIU, M.X.; FAETH, S.H.; GUNATILAKA, A.A. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **J Nat Prod.**, v. 70, n. 2, p. 227-232, 2007.

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