

**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Campus de Araraquara.**

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTITUMORAL DA FRAÇÃO
TERPENÓIDICA E DE β -SITOSTEROL OBTIDOS DE *QUALEA MULTIFLORA***

Camila Bernardes de Andrade Carli

Dissertação apresentada ao Programa em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (área de Imunologia), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara-SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

C282a Carli, Camila Bernardes de Andrade
Atividade antiinflamatória e antitumoral da fração terpenoídica e de β -sitosterol obtidos de *Qualea multiflora*. / Camila Bernardes de Andrade Carli. – Araraquara, 2009.
96 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquit Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

1.Macrófagos. 2.Qualea multiflora. 3.Atividade antitumoral. 4.Imunologia clínica.
I.Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Este 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 (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Agradecimientos

*Aos meus pais que sempre me incentivaram e me ensinaram
a ser quem sou hoje! Certamente esta é uma conquista
deles também!*

*Ao meu grande Amor, Amigo e Companheiro, por sempre acreditar em mim
e por toda paciência nestes anos de convivência. O sucesso de nosso
amor está na capacidade que temos em caminharmos sempre
na mesma "direção"! Obrigada por fazer meus dias
mais leves e felizes!*

A minha Querida orientadora Iracilda Zeppone Carlos, que me ensinou a ser uma profissional responsável e dedicada e me fez amar ainda mais a pesquisa.

Devo muito do que sou hoje a você! Obrigada mesmo por toda dedicação, empenho e amizade!

Aos colegas de trabalho que fizeram os momentos difíceis menos árduos com a constante ajuda e carinho.

*As minhas amigas "Cabeças" pela descontração e por toda a amizade durante os
anos de convivência!*

A Marisa Campos Polesi Placeres por toda a ajuda e amizade.

Ao Instituto de Química pela paciência e ajuda.

*A Ana Lúcia Martiniano Nasser pela grande ajuda e pelo fornecimento dos
materiais da planta estudada.*

Ao Projeto BIOTA-FAPESP

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida*

RESUMO

Os produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas superiores, têm contribuído para o desenvolvimento da terapêutica moderna. Atualmente existe um interesse renovado na investigação de plantas medicinais como alternativa ao tratamento de doenças como câncer e inflamações crônicas. *Qualea multiflora* Mart (*Q. multiflora*) família Vochysiaceae é uma planta utilizada na medicina popular no tratamento de úlceras, gastrites, amebíase, diarreia com sangue, cólicas intestinais e inflamações. O sistema imunológico é um notável sistema de defesa que evoluiu nos vertebrados para protegê-los de agentes agressores. Neste sistema, os macrófagos têm um papel central, pois são células capazes de secretar mais de cem produtos biologicamente ativos, entre esses, espécies reativas de nitrogênio e citocinas que atuam no contexto da resposta imunológica e/ou inflamatória. Neste trabalho, foram avaliadas as atividades antiinflamatória e antitumoral de uma fração terpenoídica e da substância β -sitosterol, isoladas a partir da planta *Q. multiflora*. Experimentos *in vitro* foram realizados para determinar as atividades destes componentes no sistema imune através de ensaios de determinação de citotoxicidade (MTT), óxido nítrico (NO), determinação do fator de transcrição NF- κ B, das citocinas IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e IL-10. Além disto, também foram realizados testes com o objetivo de avaliar a atividade antitumoral dos compostos testados frente às linhagens tumorais murinas LM3 e LP07. Os resultados mostraram intensa inibição da produção de NO e das citocinas IL-1, IL-12 e TNF- α ; moderada inibição do fator de transcrição NF- κ B pelos macrófagos peritoneais estimulados com a fração terpenoídica e com β -sitosterol. Por outro lado, não houve inibição da produção de IL-6. De maneira contrária às outras citocinas testadas, houve uma grande estimulação da produção da citocina pró-inflamatória IL-10, caracterizando um efeito antiinflamatório. No que se refere à atividade antitumoral das amostras testadas, as mesmas mostraram significativo efeito citotóxico sobre as linhagens celulares tumorais, com reduzido efeito tóxico sobre os macrófagos. Estes promissores resultados sugerem o possível uso de *Q. multiflora* no controle de inflamações e no combate a alguns tipos de tumores, através de suas atividades imunomodulatórias e antiproliferativas.

Palavras-chaves: Macrófagos, Interleucinas, Óxido nítrico, Atividade antitumoral e *Qualea multiflora*.

ABSTRACT

Natural products, including those derived from upper plants, have contributed to a large extent for the development of modern therapeutics. Lately, there is a renewed interest in the investigation of medicinal plants as an alternative for the treatment of diseases such as cancer and chronic inflammations. *Qualea multiflora* Mart (Vochysiaceae) is a plant used in popular medicine for the treatment of ulcers, gastritis, amoebiasis, diarrhea with blood, intestinal colics and inflammations. The immune system is a remarkable defense mechanism that evolved in the vertebrate animals to protect them against pathogenic micro-organisms and cancer, among other functions. In this system, macrophages have a central role, since they are capable of secreting more than 100 biologically active products, among which, nitrogen reactive intermediaries and cytokines which act in the context of the immune and/or anti-inflammatory response. In this work, it was evaluated the anti-inflammatory and anti-tumoral activities of a terpenoidic fraction and of the β -sitosterol substance, obtained from *Q. multiflora*. *In vitro* experiments were performed in order to determine the activities of those samples upon the immune system through assays for the determination of cytotoxicity (MTT), nitric oxide (NO), transcription factor NF- κ B, and cytokines IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α . Furthermore, tests were also performed with tumoral lineages LM3 and LP07, in order to evaluate the antitumoral activities of those samples. The results evidenced intense inhibition of the production of NO and IL-1, IL-12 e TNF- α ; moderate inhibition of transcription factor NF- κ B by the peritoneal murine macrophages when stimulated with the terpenoidic fraction and with the β -sitosterol substance. On the other hand, it was not inhibition of the IL-6 production. Inversely, there was a great stimulation of the production of anti-inflammatory cytokine IL-10, a desirable effect in anti-inflammatory drugs. As far as anti-tumoral activities are concerned, the samples evidenced extreme cytotoxic effect against the tumoral lineages, with little toxicity on the macrophages, thus reflecting a highly selective effect. Those promising results suggest the possible use of *Qualea multiflora* in the treatment of inflammations and in the control of some types of tumours, thanks to their immunomodulatory and anti-proliferative activities with reduced impact on the peritoneal exsudate cells.

Key Words: Macrophages, Interleukins, Nitric oxide, Antitumour activity and *Qualea multiflora*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore <i>Qualea multiflora</i>	22
Figura 2: Flores da árvore <i>Qualea multiflora</i>	22
Figura 3: Viabilidade de macrófagos peritoneais frente à exposição de diferentes concentrações das frações A e ao β -sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i>	37
Figura 4: Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β -sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i>	39
Figura 5: Concentração de TNF- α liberado por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β -sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i>	42
Figura 6: Concentração de IL-1 liberada por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β -sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i>	45
Figura 7: Concentração de IL-6 liberada por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β -sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i>	48
Figura 8: Concentração de IL-12 liberada por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β -sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i>	51
Figura 9: Concentração de IL-10 liberada por macrófagos peritoneais expostos à fração terpenoídica e ao β -sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i>	54
Figura 10: Concentração de NF- κ B nuclear liberada por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β -sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Produção de NO em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i> , expressa em µmols/5x10 ⁵ células.....	40
Tabela 2 : Produção de TNF-α em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i> , expressa em pg/mL.....	43
Tabela 3 : Produção de IL-1 em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i> , expressa em pg/mL.....	46
Tabela 4 : Produção de IL-6 em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i> , expressa em pg/mL.....	49
Tabela 5 : Produção de IL-12 em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i> , expressa em pg/mL.....	52
Tabela 6 : Produção de IL-10 em macrófagos peritoneais expostos à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i> , expressa em pg/mL.....	55
Tabela 7 : Produção de NF-κB em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de <i>Qualea multiflora</i> , expressa em ng/mL.....	58
Tabela 8 : Valores de IC ₅₀ (mg/mL) para as linhagens celulares LM3 e LP07 após 24h de incubação.....	59
Tabela 9 : Viabilidade celular nas culturas celulares no per.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
µmols	micromols
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador protein-1
BSA	Bovine serum albumin
Ca ²⁺	Cálcio ²⁺
CO ₂	Dióxido de carbono
cNOS	Óxido nítrico sintetase constitutiva
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfurico
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IQ	Instituto de Química
IFN-γ	Interferon-gama
IκB	Inativador κ-B
IKK	I-κ-B-kinase
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
L	Litro
LM3	Linhagem de adenocarcinoma de mama
LP07	Linhagem de adenocarcinoma de pulmão
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	Mililitros
mM	Micro molar
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico

NaCl	Cloreto de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
ng/mL	Nanogramas por mililitro
NK	Natural Killer
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PMSF	phenylmethanesulphonylfluoride or phenylmethysulphonyl fluoride
RNI	Intermediários reativos do nitrogênio
ROI	Intermediários reativos do oxigênio
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura – série 1640)
STAT	Signal transducers and activators of transcription
Th1	Tipo de linfócito T <i>helper</i>
Th2	Tipo de linfócito T <i>helper</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta
xg	Força Centrífuga Relativa

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Gênero <i>Qualea</i>	21
2.2 Sistema Imunológico.....	23
2.3 Vias de Sinalização.....	25
2.4 Produtos naturais no Tratamento do Câncer.....	26
3.OBJETIVO GERAL.....	28
3.1 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Etapa Botânica.....	28
4.1.1 Obtenção do extrato bruto, fração terpenoídica e β -sitosterol de <i>Qualea multiflora</i>	28
4.1.2 Obtenção das soluções a serem utilizadas nos ensaios biológicos.....	29
4.2 Animais.....	29
4.3 Controle analítico da coloração natural das soluções obtidas de <i>Q.multiflora</i>	29
4.4 Linhagens Celulares.....	29
4.5 Obtenção dos macrófagos do exsudato peritoneal.....	30
4.6 Avaliação da Citotoxicidade em cultura de macrófagos.....	30
4.7 Determinação da inibição da produção de óxido nítrico (NO).....	31
4.8 Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais.....	32
4.9 Determinação das citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α	32
4.10 Determinação do fator de transcrição NF- κ B.....	33
4.10.1 Obtenção da fração nuclear.....	33
4.10.2 Ensaio de determinação do fator de transcrição NF- κ B.....	34
4.11 Determinação da atividade citotóxica em linhagens tumorais.....	35
4.12 Análise Estatística.....	35

5. RESULTADOS.....	36
5.1 Avaliação da Citotoxicidade em cultura de macrófagos.....	36
5.2 Determinação da inibição da produção de óxido nítrico (NO).....	38
5.3 Determinação da inibição da produção da citocinas TNF- α	41
5.4 Determinação da inibição da produção da citocinas IL-1.....	44
5.5 Determinação da inibição da produção da citocinas IL-6.....	47
5.6 Determinação da inibição da produção da citocinas IL-12.....	50
5.7 Determinação da produção da citocinas IL-10.....	53
5.8 Determinação do fator de transcrição NF- κ B.....	56
5.9 Determinação da atividade citotóxica em linhagens tumorais.....	59
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÕES.....	69
8. REFERÊNCIAS.....	70

CAPÍTULO 2

ARTIGO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O uso de extratos vegetais para fins medicinais é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade. A Organização Mundial de Saúde estima que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (WHO, 1998).

O Brasil possui cinco áreas de grande abundância de plantas nativas, estando entre elas o bioma Cerrado. Este é o segundo maior em área do país, ocupando 25% do território nacional (dois milhões de km²), estando localizado basicamente no planalto central e sendo considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica (RIBEIRO e WALTER, 1998; SANTO, 2001).

Ainda há carência de estudos voltados para a identificação de plantas úteis do cerrado, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada. O desconhecimento de sua riqueza e possibilidades se agrava quando Ratter et al. (1997) estimam que cerca de 40% do bioma já tenha sido devastado e quando Kaplan et al. (1994) afirmam que o Cerrado possui somente 1,5% de sua extensão protegida por lei, sendo atualmente a vegetação em maior risco no país. Gottlieb e Borin (1994) relatam que há possivelmente mais espécies vegetais (diversidade específica) em áreas amostrais de Floresta Amazônica que nas de Cerrado de mesmo tamanho salientando, porém que a diversidade taxonômica é certamente muito maior no último. Para tanto, muitos estudos serão necessários para conhecer o potencial deste bioma tão rico.

Em colaboração a estes estudos foi determinada a atividade imunológica de uma fração constituída de um “pool” das moléculas terpênicas Lupeol, Friedelina, Lupenona (fração terpenoídica) e da substância β -sitosterol, isoladas a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora* Mart (*Q. multiflora*) pertencente à família Vochysiaceae.

A atividade eficaz dos produtos naturais pode-se iniciar com a participação do sistema imunológico. Dentro deste sistema, os macrófagos são células pertencentes à imunidade inata que possuem várias funções tais como a eliminação de corpos estranhos, apresentação de antígenos e ativação das células T através da produção de citocinas (ADAMS e HAMILTON, 1984; MACKANESS, 1962; ALLAVENA et al., 2008). A ativação dos macrófagos é um evento chave na imunidade inata para iniciação e propagação de reações defensivas contra patógenos, porém a ativação descontrolada destas e de outras células do sistema imune pode resultar em condições patológicas de inflamações crônicas.

A inflamação é uma resposta benéfica do hospedeiro a desafios exógenos ou agressão tecidual que leva a restauração da estrutura e função tecidual normal. Uma resposta inflamatória normal é auto limitada e envolve a regulação negativa da expressão de proteínas pró-inflamatórias, aumento da expressão de proteínas antiinflamatórias e uma mudança do tônus vascular que facilita o processo de recrutamento inicial das células imunes. A inflamação prolongada contribui para a patogênese de muitas doenças inflamatórias, incluindo bronquite, gastrite esclerose múltipla, artrite reumatóide e câncer (SAKAGAMI et al., 1997; VERNOOY et al., 2002; KLOTZ et al., 2005; MANTOVANI et al., 2008). Além disto, processos inflamatórios desencadeados por alguns tipos de tumores provocam a liberação de fatores angiogênicos, mitógenos, enzimas proteolíticas e fatores quimiotáticos pelas células imunológicas. Conseqüentemente a liberação destas substâncias recrutam ainda mais células inflamatórias, sustentando o crescimento, invasão e angiogênese tumoral (YAN et al., 2006, MANTOVANI, 2009).

Uma das principais moléculas liberadas pelos macrófagos em processos inflamatórios é o óxido nítrico (NO). O papel principal deste mediador como mensageiro e molécula efetora em uma variedade de tecidos tem sido extensivamente estudada (PALMER et al., 1988; LOWENSTEIN et al., 1996; ALLAVENA et al., 2008). Uma grande produção de NO induzida por LPS ou citocinas como TNF- α , IL-1 e IFN- γ , pode causar danos teciduais e estar relacionado à diversas condições patológicas (GIDDAY et al., 1998; STOCLET et al., 1998; JAISWAL et al., 2000; BABBAR et al., 2006). Adicionalmete, pesquisas têm revelado o envolvimento da excessiva liberação de NO na carcinogênese através da estimulação de processos tais como iniciação, promoção, progressão, metástase e angiogênese (HOFSETH et al., 2003). Portanto, medicamentos que têm como atividade a inibição da produção de NO podem ser importantes fontes de tratamento de doenças inflamatórias crônicas e câncer (CARLI et al, 2009).

Além do NO, outras moléculas imunológicas estão envolvidas em processos inflamatórios. As citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α são conhecidas por serem citocinas pró-inflamatórias que possuem uma multiplicidade de atividades biológicas ligadas a imunopatogenicidade de doenças inflamatórias crônicas e agudas (EIGLER et al, 1997; RIGBY et al., 2007). O papel do TNF- α inclui ativação e quimiotaxia dos leucócitos, indução da expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos, células endoteliais e na regulação da secreção de outras citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER e CERAMI, 1988). A mesma citocina tem efeitos sistêmicos, muitas vezes prejudiciais, tais como febre, edema sistêmico e choque séptico, podendo também atuar como um fator de progressão tumoral através da

modulação da motilidade tumoral ou pelo aumento de moléculas de expressão nos órgãos alvos (GELIN et al., 1991; JANEWAY et al., 2001; ARNOTT et al., 2004).

As citocinas TNF- α e IL-1 ou ainda estímulos bacterianos ou virais podem estimular a produção de IL-6. Por outro lado, estudos recentes demonstraram a influência de citocinas como a IL-4 e IL-10 na inibição da produção de IL-6 (STRIZ et al., 1999). A IL-6 tem funções tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, sendo uma de suas principais funções a indução de anticorpos por células B (AKIRA et al., 1990). Além disto, recentes estudos mostram o papel de IL-6 na tumorigenese hepatocelular em ratos (NAUGLER et al., 2007)

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno em resposta a estimulação por uma série de microrganismos e seus produtos. Possui atividades biológicas múltiplas principalmente através de linfócitos T e células NK, induzindo a produção de Inteferon- γ (IFN- γ) e conseqüente amplificação da resposta imune celular. 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 e SCOTT, 1999; MARKIEWICZ et al., 2009)

De maneira oposta às citocinas citadas acima, a IL-10 é uma molécula que expressa propriedades imunossupressoras e antiinflamatórias contendo a amplificação dos processos inflamatórios. A IL-10 é produzida por linfócitos Th₂, macrófagos, mastócitos e células B. Possui uma variedade de funções incluindo a regulação negativa da ativação das células T, da produção de IFN- γ , IL-1, TNF- α , supressão da proliferação e ativação dos macrófagos e inibição da produção de NO (CLEMONS et al., 2000; NAUNDORF et al., 2009).

A produção de todas as citocinas já descritas está intrinsicamente relacionada à ativação de fatores de transcrição. Diferentes vias de sinalização participam da ativação de macrófagos através de vários estímulos. Estímulos como o LPS, por exemplo, ativam vias de sinalização através de uma cascata de reações citoplasmáticas que são finalizadas pela ativação de fatores de transcrições, como NF-kB e AP-1. O NF-kB é um fator transcricional relacionado à ativação dos macrófagos através da ligação à regiões promotoras de genes relacionados a expressão de TNF- α , iNOS, IL-6, e COX-2. Além disso vários estudos comprovam a influência do aumento da expressão deste fator na grande maioria dos tumores

(SWEET e HUME, 1996; GHOSH e KARIN, 2002; LUO et al., 2007).

Muitos estudos são realizados para determinação da atividade imunomodulatória de produtos naturais através da determinação da produção de citocinas pró-inflamatórias e da avaliação da expressão de NF- κ B. Estudos mostraram que Astaxanthin (carotenóide) inibe a expressão de iNOS, COX-2 NF- κ B (LEE et al., 2003; CHOI et al., 2008). Em outro estudo, diterpenóides apresentaram atividade supressora da atividade inflamatória através da inibição do fator de transcrição NF- κ B, inibindo a produção de NO, TNF- α e COX-2 (GIRÓN et al., 2008). Kim et al (2008) determinaram a atividade antiinflamatória do flavonóide isoliquiritigenina isolada a partir de *Glycyrrhiza uralensis* mostrando que esta substância apresentou intensa inibição da produção de NO, iNOS, COX-2, IL-6 e TNF- α , devido a inibição de NF- κ B.

Durante os três anos de Iniciação Científica (IC), realizamos testes com o objetivo de determinar o perfil antiinflamatório dos extratos brutos pertencentes às espécies *Q. multiflora* e *Qualea grandiflora*. Ambas as planta apresentaram atividade inibitória da produção de NO, IL-1 e IL-12 em 24, 48 e 72 hs. A partir destes resultados, direcionamos o estudo para a espécie mais promissora durante o mestrado, realizando ensaios com a fração terpenoídica e com a substância isolada β -sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*. Desta maneira, com o presente estudo foi possível identificar as classes de substâncias presentes na planta que são responsáveis pela atividade antiinflamatória anteriormente observada pelo extrato bruto, além de realizarmos um estudo comparativo entre as atividades da fração terpenoídica e da substância isolada β -sitosterol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Gênero *Qualea*

O gênero *Qualea* ocorre em toda a América tropical, desde o México, passando pelo Peru e Guianas, até o Brasil onde tem presença marcante no cerrado. As espécies são conhecidas popularmente como mandioqueira ou quaruba (CÔRREA, 1974). Pott e Pott (1994) demonstraram a ocorrência de taninos em *Qualea parviflora*, sendo que a casca em pó ou chá é usada como antisséptico externo, enquanto que as folhas são usadas contra azia. As cascas, entrecascas e folhas de *Qualea grandiflora* são usadas como adstringente e antidiarréico, para limpeza de úlceras externas e também contra inflamações (SEPTÍMO, 1994; ALMEIDA et al., 1998). Além disso trabalhos recentes mostram que a planta *Q. grandiflora* apresenta atividade antimicrobiana e antiulcerogênica (HIRUMA-LIMA et al., 2006; COSTA et al., 2008). Outros estudos indicam que *Q. grandiflora* tem ação no sistema nervoso central, ação analgésica e se comporta como um anticonvulsivante (GASPI, et al., 2006). Grandi et al (1989) reportaram que o decocto das folhas de *Qualea* sp. é usado para úlceras, gastrites, amebíase, diarréia com sangue e cólicas intestinais. Estudos recentes mostram a presença de derivativos do ácido elágico nas espécies de *Qualea* (NASSER, et al., 2008).



Figura 1: Árvore *Q. multiflora*



Figura 2: Flores da árvore de *Q. multiflora*

2.2 Sistema imunológico

A atividade protetora contra microrganismos ou partículas estranhas é essencial para a manutenção da vida. Esta proteção é realizada através do sistema imunológico, que se apresenta sempre em vigília contra agentes agressores. Para que este objetivo seja alcançado, milhares de substâncias são lançadas no organismo, na tentativa de conter o processo inflamatório e/ou infeccioso. As células imunológicas são responsáveis pela liberação destas moléculas efetoras e dentre estas células os macrófagos possuem importante papel na contenção do agente agressor, sendo uma das principais células do sistema imune inato envolvidas na defesa do hospedeiro. Além de possuir papel de destaque na imunidade inata, estas células se comportam como importantes mediadores da imunidade inata e adaptativa. Em particular, os macrófagos são responsáveis pelo processamento e apresentação de antígeno às células T antígeno específicas. (IONTCHEVA et al., 2004)

Uma vez ativados, os macrófagos iniciam a produção de citocinas, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio e eicosanóides. Nos macrófagos, o LPS é o estímulo melhor caracterizado para a indução de genes transcricionais codificadores de proteínas pró-inflamatórias. Tal estimulação resulta na síntese de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO). O NO produzido pela iNOS através da conversão de L-Arginina em L-citrulina, desempenha um papel central nas reações inflamatórias. (MACMICKING et al., 1997). Estudos anteriores descrevem o envolvimento de níveis elevados de iNOS na carcinogênese, incluindo iniciação, promoção, progressão, metástase e angiogênese tumoral. Além disto, este mediador tem sido reconhecido como importante mensageiro em diversas funções fisiopatológicas, incluindo transmissão neuronal, relaxamento vascular, modulação imune e indução de tumoral (NATAN, 1987; LOWENSTEIN et al., 1996; CHEN e STONER, 2004). Para tanto a produção desta molécula efetora é realizada por diferentes enzimas, entre elas a iNOS (induzível), nNOS (neuronal) e eNOS (endotelial). Ambas as enzimas eNOS e nNOS são constitutivas e suas ativações são dependentes da interação com a calmodulina, que é controlada pelos níveis de cálcio (Ca^{2+}) (MONCADA, 1991; MARLETA, 1993) De maneira oposta, em macrófagos, a iNOS é cálcio independente e sua atividade enzimática é induzida por citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-1 e estímulos microbianos (DRAPIER et al., 1988; HIBBS et al., 1992; SURH et al., 2007).

As citocinas são peptídeos endógenos de pequeno peso molecular amplamente envolvidos na resposta imune. Estas moléculas solúveis liberadas por linfócitos e células do sistema fagocitário, são essenciais na comunicação intercelular e em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Elas modulam a inflamação e a imunidade regulando o

crescimento e a diferenciação de leucócitos e 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, efeitos na maioria relacionados a processos imunomodulatórios e inflamatórios (CASALE et al., 1996). Atua na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções. Esta molécula ainda tem a capacidade de induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e várias quimiocinas (PALLADINO et al., 2003).

A IL-1 é produzida principalmente por monócitos e macrófagos e possui uma gama de atividades biológicas, entre elas, o aumento da quimiotaxia de linfócitos T e B, estimulação da síntese de tromboxanos por neutrófilos e macrófagos, indução de proteínas de fase aguda, ativação de linfócito T e aumento da produção de anticorpos pelas células B (MIZEL, 1982; FALKOFF et al., 1983; DINARELLO, 1988; BIRD et al., 2002).

Por outro lado, a IL-6 é uma citocina que funciona em ambas as imunidades adaptativa e inata. Esta molécula é sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos. Na imunidade inata, esta molécula estimula a síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos contribuindo desta maneira com o efeito sistêmico da inflamação. Na imunidade adaptativa, esta citocina estimula a diferenciação de linfócito B em células produtoras de anticorpos (plasmócitos). Além disso, IL-6 age similarmente como um fator de crescimento para plasmócitos neoplásicos (mieloma) e a inibição desta citocina reduz os riscos de desenvolver cancer hepático em ratos fêmeas (ABBAS et al., 2003; NAUGLER et al., 2007).

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno em resposta a estimulação por uma série de microrganismos e seus produtos. Possui atividades biológicas múltiplas principalmente através de linfócitos T e células NK, induzindo a produção de interferon- γ (IFN- γ). 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 na cascata de citocinas (TRINCHIERI, 1994; SENCHINA et al., 2005).

De maneira oposta às citocinas citadas acima, a IL-10 é considerada uma citocina antiinflamatória, que inibe a produção de outras citocinas e desativa os macrófagos, atuando como um mecanismo de feedback negativo para evitar efeitos indesejados a partir da

excessiva ativação de macrófagos durante a inflamação (BOGDAN et al., 1991; NAUNDORF et al., 2009). Esta molécula é produzida por monócitos, células B e células T e também está associada à diferenciação de células Th₂. Sua atuação na inibição das funções de macrófagos inclui a inibição do *burst* oxidativo, inibição de NO e das citocinas TNF- α e IL-1 (GAZZINELI et al., 1992; OSWALD et al., 1992; NAUNDORF et al., 2009).

Ainda dentro do contexto do sistema imunológico, é relevante destacar a importância do mediador NO e de todas as citocinas já descritas em processos patológicos como a inflamação. A inflamação é o resultado da resposta do hospedeiro a patógenos ou danos teciduais e geralmente resulta em restauração das funções e reestruturação do tecido normal. As respostas inflamatórias normalmente são auto-limitadas por um processo que envolve a regulação negativa de mediadores e citocinas pró-inflamatórias e regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias (LAWRENCE et al., 2002). Portanto, a inflamação aguda é um processo limitado e benéfico, enquanto que a inflamação crônica é um fenômeno persistente que pode desencadear o desenvolvimento de doenças inflamatórias tais como, bronquite, gastrite, esclerose múltipla, artrite reumatóide e câncer (SAKAGAMI et al., 1997; VERNOOY et al., 2002; PONCHEL et al., 2002; KAPLANSKI et al., 2003; FICHTNER-FEIGL et al., 2005; KLOTZ et al., 2005; FEDERICO et al., 2007).

2.3 Vias de sinalização

Estímulos bacterianos, como LPS, ativam a produção de citocinas através da indução de genes pró-inflamatórios. Esta indução é mediada através da ativação de diversos fatores de transcrição. Entre estes fatores de transcrição, o NF- κ B é um dos reguladores principais responsáveis pela expressão de genes pró-inflamatórios. A regulação descontrolada de NF- κ B tem sido implicada na patogênese de muitas doenças, que incluem desordens neurodegenerativas, doenças inflamatórias e autoimunes, isquemia e câncer (LIU e MALIK, 2006). O NF- κ B está associado à uma proteína inibitória conhecida como I κ Bs. No momento em que esta proteína inibitória é desacoplada do NF- κ B, o mesmo é liberado no citoplasma na forma ativada composto pelas subunidades p65 e p50 (LI e VERMA, 2002). Detalhadamente, a indução de NF- κ B em respostas a estímulos pró-inflamatórios envolve a fosforilação de I κ Bs em dois resíduos críticos de serina (Ser32, Ser36) pelo IKK (signalosome complexo) (O'CONNELL et al., 1996). Após a fosforilação de I κ B, o mesmo sofre ubiquitinação e é degradado pelo proteossomo 26S (SANCHEZ-PEREZ et al., 2002). A partir deste momento, o NF- κ B livre é translocado ao núcleo, se liga à sítios ligadores de κ B na região promotora de

genes alvos, induzindo a transcrição de mediadores pró-inflamatórios tais como, iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (SURH et al., 2001; LAPPAS et al., 2002; KARIN, 2006). Estudos recentes apontam o papel deste fator de transcrição na carcinogênese através de sua ação na indução da evasão da apoptose, aumento do potencial replicativo, estimulação da angiogênese e metástase tumoral (HANAHA e WEINBERG, 2000; WATARI et al., 2008)

Além dos sítios ligadores para NF- κ B, a região promotora do gene da iNOS contém sítios de ligação para diversos outros fatores transcricionais tais como AP-1, elementos de resposta a interferon e a família STAT de fatores de transcrição (KLEINERT et al., 2004; SULLIVAN et al., 2007). Portanto a determinação da ativação de NF- κ B pode direcionar à via de sinalização estimulada ou inibida por alguns tipos de substâncias e indicar o possível mecanismo de ação destas moléculas sobre o sistema imunológico.

2.4 Produtos Naturais no tratamento de câncer

A busca de drogas antitumorais obtidas a partir de plantas iniciou-se anos 50 com a descoberta e desenvolvimento dos alcalóides da vinca, vinblastina e vincristina. Como resultado, o Instituto Nacional do Câncer do Estados Unidos (NCI) começou um intensivo programa de coleta de plantas em 1960, focado principalmente em regiões temperadas. Este fato levou a descoberta de diversas moléculas que mostravam uma amplitude de atividades citotóxicas, incluindo taxanos e camptotéquinas. Este programa terminou em 1982, porém o desenvolvimento de novas tecnologias para realização de triagens das atividades biológicas conduziu a reativação da coleta de plantas e outros organismos em 1986, com o foco em regiões sub-tropicais e tropicais de todo o mundo (CASSADY and DOUROS, 1980).

Algumas plantas possuem atividade antitumoral não apenas relacionadas à atividade citotóxica contra as células tumorais, mas também possui ação moduladora no sistema imunológico. Para compreender este contexto é necessário aprofundar os conhecimentos que relacionam o câncer com algumas situações patológicas inflamatórias. Para tanto é importante conhecer a dinâmica entre processos inflamatórios, reparo tecidual e proliferação celular, entre outras atividades.

Algumas agressões celulares persistentes podem causar inflamação induzindo a carcinogênese. Várias células inflamatórias e da imunidade inata como mastócitos, neutrófilos, leucócitos, macrófagos, monócitos, células dendríticas e NK são frequentemente recrutadas ao sítio de infecção ou inflamação. Em resposta a estímulos pró-inflamatórios, as células imunológicas produzem espécies reativas do oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNI), que podem funcionar como moléculas efetoras na carcinogênese relacionada a processos

inflamatórios. Desta maneira, um dos mecanismos plausíveis pelo qual a inflamação pode iniciar a tumorigenese é a geração de ROS e/ou RNI no tecido inflamado e subsequente dano no DNA levando à ativação de genes oncogênicos e/ou a inativação de genes supressores de tumor (KUNDU et al., 2008).

Acredita-se que a inflamação crônica contribui com o desenvolvimento de pelo menos 15% de todos os tipos de cânceres. Portanto, os medicamentos antiinflamatórios possuem uma utilização emergente como quimioterápicos na prevenção e no tratamento de cânceres humanos, além de estarem associados à diminuição dos riscos de surgimento de câncer de mama, pulmão e cólon (MARNETT, 1992; DUPERRON e CASTONGUAY, 1997; SHARPE et al., 2000; MANTOVANI et al., 2007).

Contudo, as plantas utilizadas com o objetivo de modular a resposta imunológica possuem características atrativas para o uso na prevenção do câncer, pois possuem uma margem de segurança em termos de toxicidade aparentemente grande quando comparadas aos antiinflamatórios não-esteroidais. As plantas têm sido extensivamente 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 destes antiinflamatórios naturais com os quimicamente desenvolvidos, permitindo o uso de doses reduzidas dos medicamentos químicos (WARGOVICH et al., 2001).

O resveratrol, encontrado no vinho tinto, pode inibir a atividade do NF- κ B e induzir a apoptose das células transformadas, reduzindo a mortalidade nas doenças coronarianas e em certos tipos de câncer. Este componente quimiopreventivo atua bloqueando o início da inflamação e da oncogênese, mostrando forte efeito inibitório na geração de NO por macrófagos ativados (TSAI et al., 1999; HOLMES-McNARY e BALDWIN JR, 2000; GOSWAMI e DAS, 2009). Além disso, compostos presentes no chá verde (*Camellia sinensis*), *milk thistle* (*Silybum marianum*) e *Curcuma longa* foram avaliados em modelos animais de carcinogênese e mostraram bons resultados além de possuírem atividade antiinflamatória, possuem compostos anticarcinogênicos e antimutagênicos (WEISBURGER et al., 1998; MANNA et al., 1999; HUANG et al., 2008).

3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo a determinação da ação de uma fração terpenoídica e da substância isolada β -sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*, sobre os macrófagos peritoneais e linhagens celulares tumorais.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar:

- 1- A citotoxicidade das amostras em culturas de macrófagos peritoneais;
- 2- A determinação da inibição de NO;
- 3- A determinação da inibição/produção do fator de transcrição NF- κ B e das citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α ;
- 4- A determinação da atividade citotóxica em linhagens tumorais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Etapa botânica

O preparo da fração terpenoídica e da substância β -sitosterol isoladas a partir do extrato bruto da planta *Q. multiflora* foi realizado, no Instituto de Química (IQ) da UNESP-câmpus Araraquara, sob a orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas.

4.1.1 Obtenção do extrato bruto , fração terpenoídica e β -sitosterol de *Qualea multiflora*.

Q. multiflora foi coletada no jardim Ypê (região do Cerrado), na cidade de Porto Nacional, estado de Tocantins-TO pela Prof. Dr. Clélia Akiko Hiruma-Lima. A planta foi identificada pela Prof. Dr. Solange de Fátima Lolis, UNITINS, Porto Nacional e depositada no herbário UNITINS (Voucher n 4158).

As folhas de *Q. multiflora* foram secas em estufa a 40 °C, triturada em moinho de faca, e extraída exaustivamente com clorofórmio. O extrato foi submetido à destilação em evaporador rotatório, fornecendo o extrato bruto. Após essa etapa, o extrato clorofórmico foi fracionado em coluna sílica gel utilizando um gradiente crescente de polaridade (hexano→cloroformio→metanol), fornecendo a fração terpenoídica, rica em Lupenona, Lupeol, Friedelina. Para isolar e purificar a substância β -sitosterol, o extrato clorofórmico de *Q. multiflora* foi fracionado em sílica gel seguido de repetidas purificações em Sephadex LH-20.

4.1.2 Obtenção das soluções a serem utilizadas nos ensaios biológicos

As substâncias testadas foram primeiramente diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para a realização dos testes. Foram preparadas soluções-mãe para todos os compostos testados. A partir da solução-mãe foram feitas diluições seriadas em meio de cultura (RPMI-1640). Vale ressaltar que a concentração final de DMSO nos testes realizados não ultrapassou 4% (concentração não citotóxica para as células, determinada previamente).

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 6 semanas, pesando entre 18 e 25g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, situado no câmpus universitário da UNESP em Araraquara. Estes foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina®) “ad libitum” em local climatizado ($23^0 \pm 2^0$ C, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas (Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, parecer nº 29/2006).

4.3 Controle analítico da coloração natural das soluções obtidas de *Q. multiflora*.

Foi realizado um controle de cor para cada substância testada para verificação da absorvância originada pelos pigmentos da planta. Foram distribuídos 100µL de cada solução de extrato acrescidos de 200µL (teste de inibição) ou 100µL (teste de produção) do meio RPMI-1640-C. A microplaca assim constituída foi levada à leitura nos diferentes comprimentos de onda correspondentes aos testes realizados no projeto.

Os valores de densidade ótica obtidos no controle de cor foram subtraídos dos valores obtidos nos testes e a seguir, determinadas as concentrações correspondentes de cada teste.

4.4 Linhagens celulares LM3 e LP07

As linhagens tumorais murinas de adenocarcinoma de mama (LM3) e de pulmão (LP07) foram gentilmente cedidas pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo - Buenos Aires - Argentina, cedido pelo Prof. Dr. Lucas L. Colombo. A linhagem LP07 foi derivada do tumor P07 mantido por diversas passagens subcutâneas. A partir da linhagem *in vivo*, obteve-se a linhagem *in vitro* chamada LP07. Por outro lado a linhagem LM3 é originada de um adenocarcinoma mamário obtido em camundongo Balb/c, com metástase para o pulmão.

As linhagens LM3 e LP07 foram mantidas em meio de cultura MEM (41500; Life Technologies, Inc.) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina, e 80 µg/mL de gentamicina, definido como meio completo, em garrafas de cultura celular (Corning) a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). As passagens foram realizadas através da adição de tripsina (0,25% de tripsina e 0,02% de EDTA, 80 mM Na₂HCO₃, 20 mM NaH₂CO₃, e 100 mM NaCl).

4.5 Obtenção de macrófagos do exsudato peritoneal

Os camundongos foram previamente estimulados através da inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3% (Difco), três a quatro dias antes da coleta das células. Após esse período, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. A coleta do exsudato peritoneal foi realizada em fluxo laminar classe 100 (Veco). O líquido peritoneal foi coletado com tampão fosfato PBS pH 7,2 em seringa e agulha e transferido para tubo estéril (Corning, Inc) para lavagem das células, centrifugando-se três vezes a 200 xg durante 5 minutos em centrífuga (Fanem), a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e as células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640-C (Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 µL de estreptomicina, 100 µL de penicilina e 2 mM de L – glutamina e assim designado como meio completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany), sendo ajustado à concentração desejada para cada ensaio em meio RPMI-1640-C.

4.6 Avaliação da citotoxicidade em cultura de macrófagos

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMAN, 1983).

A uma placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100µL por cavidade das suspensões de célula do exsudato peritoneal de camundongos, ajustadas à concentração de 5.10⁶células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C em presença de 100µL da fração terpenoídica ou de β-sitosterol + 100µL de LPS, além de 100µL de LPS a 0,5 µg/mL + 100µL de RMPI-1640-C (controle positivo) ou somente 200µL meio de cultura RPMI-1640-C, em triplicata. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 hs a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após essa

incubação, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes lavadas com PBS e depois tratadas com 100µL de uma solução de MTT (Across Organics) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi então incubada por mais 3h nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100µL de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620nm.

A partir dos resultados obtidos com viabilidade celular acima de 50%, foram escolhidas três concentrações das frações para serem utilizadas nos ensaios imunológicos, assegurando desta forma a eficácia dos testes.

4.7 Deteminação da inibição da produção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico, quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura, foi medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naphthyl-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%, utilizando NaNO₂ como padrão (GREEN et al., 1982). Os animais foram sacrificados como descrito anteriormente. A suspensão celular foi ajustada à 5.10⁶ células/mL em meio de RPMI-1640-C, e foram distribuídos 100µL dessa suspensão celular em placas de 96 cavidades estéreis (Corning Inc.). Na placa foram adicionados 100µL da fração terpenoídica ou de β-sitosterol + 100µL de uma solução de LPS a 0,5 µg/mL como agente estimulante, 100µL de LPS a 0,5µg/mL + 100µL de células (controle positivo). Em outras cavidades, foram adicionados 200µL de meio RPMI-1640-C à suspensão celular, como controle de células (controle negativo). A placa assim constituída foi incubada por 24, 48 e 72 hs em estufa a 37°C com tensão constante de CO₂ a 5% (Forma Scientific). Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50µL de cada amostra, transferidas para uma outra placa e adicionados 50µL/cavidade de reagente de Griess. Após 10 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/visível de microplacas (Multiskan *Ascent*, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) com filtro de 540nm. As concentrações de NO liberadas foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI-1640. Os testes foram feitos em triplicata e os valores expressos em µmol de NO/5.10⁵ células.

4.8 Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação da inibição da produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α e na determinação da produção de IL-10. 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 1mL 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 inibição da produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α foi adicionado às células aderentes 1mL de RPMI-1640-C, 1mL da fração terpenoídica ou de β -sitosterol e 1mL de LPS a 0,5 μ g/mL aos macrófagos que ficaram aderidos à placa. Da mesma forma, 1mL de LPS a 0,5 μ g/mL + 2mL de RPMI-1640-C foi utilizado como controle positivo e 3mL de RPMI-1640-C como controle de negativo.

Na determinação da produção de IL-10, após a incubação foram adicionados às cavidades, 1mL de RPMI-1640-C e 1mL da fração terpenoídica ou de β -sitosterol aos macrófagos que ficaram aderidos à placa. Da mesma forma, 1mL de LPS (0,5 μ g/mL) + 1mL de RPMI-1640-C foi utilizado como controle positivo e 2mL de RPMI-1640-C 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, 48 e 72 hs. Após esta incubação, o conteúdo das placas foi transferido para tubos do tipo *ependorfs* que foram, em seguida, centrifugados a 7800 xg durante 10 minutos em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados em tubos do tipo *ependorfs* e armazenados em freezer a -80° C até o momento da determinação das citocinas através do teste imunoenzimático, ELISA.

4.9 Determinação das citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α .

As citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α foram quantificadas nos sobrenadantes obtidos das culturas de macrófagos através do teste imunoenzimático ELISA de captura para cada citocina (Pharmigen), 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-IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α de camundongo purificado obtido em ratos, na concentração de 4 μ g/mL (100 μ L/cavidade) diluído em tampão PBS e incubado “overnight” à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com solução salina

tamponada com fosfatos, pH 7,2 (PBS) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, foram bloqueadas com 300 µL de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas três vezes com PBS-T. Foram adicionados à placa 100 µL da citocina padrão ou sobrenadantes das culturas de células peritoneais de camundongos. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas quatro vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 µL/cavidade de anticorpo monoclonal de cabra anti-IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α de camundongo marcado com biotina na concentração de 400 ng/mL em diluente de reagente (1%BSA, 0,05% de Tween 20 em tampão Tris-NaCl). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 µL do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS/BSA e incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e 100 µL do substrato (10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina [SIGMA] e 1,2 mM de H₂O₂) foram adicionados a cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de H₂SO₄ 2N. A absorvância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland) e as concentrações das citocinas foram quantificadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α padrão. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picog/mL.

4.10 Determinação do fator de transcrição NF- κ B

A quantificação do fator NF- κ B (sub-unidade p65) presente no núcleo de macrófagos estimulados com LPS foi avaliada utilizando o kit NF- κ B ActivELISA™ (Ingenex). Para tanto, foi necessária a obtenção dos extratos nucleares das células do exsudato peritoneal murino.

4.10.1 Obtenção da fração nuclear

As células do exsudato peritoneal foram obtidas assepticamente, conforme descrito anteriormente, e a concentração celular foi ajustada a 2.10⁶ células/mL em RPMI-1640-C. A obtenção do extrato nuclear foi feita utilizando-se o Lysate Preparation Module, contido no kit NF- κ B ActivELISA™ (Ingenex), utilizando-se tampões e soluções que acompanhavam o mesmo, de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de 2mL desta suspensão

celular foi transferida para um tubo cônico e foi centrifugada a 400 xg , por 5 minutos, a 4°C e o sedimento lavado com PBS-PMSF. O sedimento foi mantido em gelo e tratado com 1mL do tampão de lise hipotônico, homogeneizando com a pipeta e incubado por 15 minutos no gelo. Após a incubação, cada tubo foi acrescentado de 50 μ L da solução detergente 10% e agitado vigorosamente por 10 segundos. As células foram centrifugadas por 30 segundos, a 20000 xg (Hettich, Inc.), a 4°C. O sedimento foi, então, tratado com o tampão de lise nuclear, constituído de DTT, tampão de extração e (Protease Inhibitor Cocktail), homogeneizando muito bem com a pipeta e agitado vigorosamente por 30 segundos. Foram incubados por 30 minutos, a 4°C e, em seguida, centrifugado a 4°C a 20000 xg (Hettich, Inc.), durante 10 minutos e o sobrenadante obtido foi coletado e acondicionado a -80°C até o momento da realização do teste.

4.10.2 Ensaio de determinação do fator de transcrição NF- κ B

Este ensaio foi realizado conforme as instruções fornecidas pelo protocolo do kit NF- κ B/p65 ActivELISA™ (Imgenex) e empregando-se as soluções e tampões que acompanhavam o mesmo. As placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com o anticorpo de captura e incubadas “overnight” (12-24h), a 4°C. Após esta incubação, as placas foram lavadas e bloqueadas utilizando-se o tampão de lavagem contendo 1% de BSA. Em seguida, foram adicionados 100 μ L das amostras e do padrão de NF- κ B em diferentes concentrações. As amostras foram diluídas 1/20 em tampão de bloqueio a fim de se alcançar a concentração de 15 a 1000ng/mL de extrato nuclear, sugerida pelo fabricante. As placas foram novamente incubadas por 4 horas, em temperatura ambiente. Durante esta incubação, foi proporcionada a ligação específica da forma ativa do NF- κ B, contida nos extratos nucleares, aos anticorpos específicos imobilizados nas cavidades da placa. Terminado este período de incubação, as cavidades foram lavadas 4 vezes com 300 μ L por cavidade de tampão de lavagem. Foram adicionados então 100 μ L por cavidade do anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio e as placas foram incubadas por uma hora, em temperatura ambiente. Após esta incubação, as cavidades foram novamente lavadas quatro vezes com o tampão de lavagem (300 μ L por cavidade) e o anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina foi adicionado (100 μ L por cavidade). Ao término de mais uma incubação de 1 hora em temperatura ambiente, foram executadas cinco lavagens como já descrito acima.

Como última etapa do ensaio, foram adicionados às cavidades 100 μ L da solução de substrato (1mg/mL) (pNPP - p-Nitrofenil fosfato) e a placa foi incubada por 30 minutos,

em temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems), usando-se o filtro de 405 nm.

4.11 Determinação da atividade citotóxica em linhagens tumorais

O crescimento celular foi quantificado através do ensaio de MTT, previamente descrito. As células foram desprendidas da garrafa de cultura celular com tripsina, lavadas e transferidas para microplacas de 96 na concentração de 3.10^4 células/mL. 190 μ L da suspensão celular tumoral foram adicionadas aos poços e incubadas a 37 °C com pressão constante de 5% CO₂. As microplacas contendo as células foram pré-incubadas por 24h para permitir sua estabilização para a adição de amostras. Depois deste período 100 μ L da fração terpenoídica ou de β -sitosterol foram adicionados e incubados por 24 hs nas mesmas condições citadas acima. Taxol[®] (Paclitaxel, BMS) foi usado como controle positivo. Após a cultura o meio foi trocado por outro contendo 1mg/mL de MTT. Após 3h, o meio foi removido e 100 μ L de isopropanol (Mallinckrodt) foram adicionados para solubilizar os cristais de formazana formados. A absorvância foi quantificada em 540 nm, com filtro de referência de 620 nm em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems). A concentração inibitória de 50% do crescimento celular (IC₅₀) foi definida como a dose que resulta em 50% de redução da proliferação celular tumoral e foi calculada com Microcal Origin, através de uma regressão linear (MOSMANN, 1983).

4.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada executando-se uma análise de variância (ANOVA) e uma comparação das médias, utilizando o pós-teste de Tukey com o auxílio do programa Graphpad Instat versão 3.05. O nível de significância foi de 5%, ou seja, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade em cultura de macrófagos

Na Figura 3 observamos que a fração terpenoídica e a substância β -sitosterol apresentaram pouco efeito citotóxico sobre os macrófagos estimulados com LPS, em todos os períodos de incubação. No entanto os resultados mostram que o β -sitosterol apresentou maior efeito tóxico quando comparado a fração terpenoídica, principalmente no período de incubação de 24 hs.

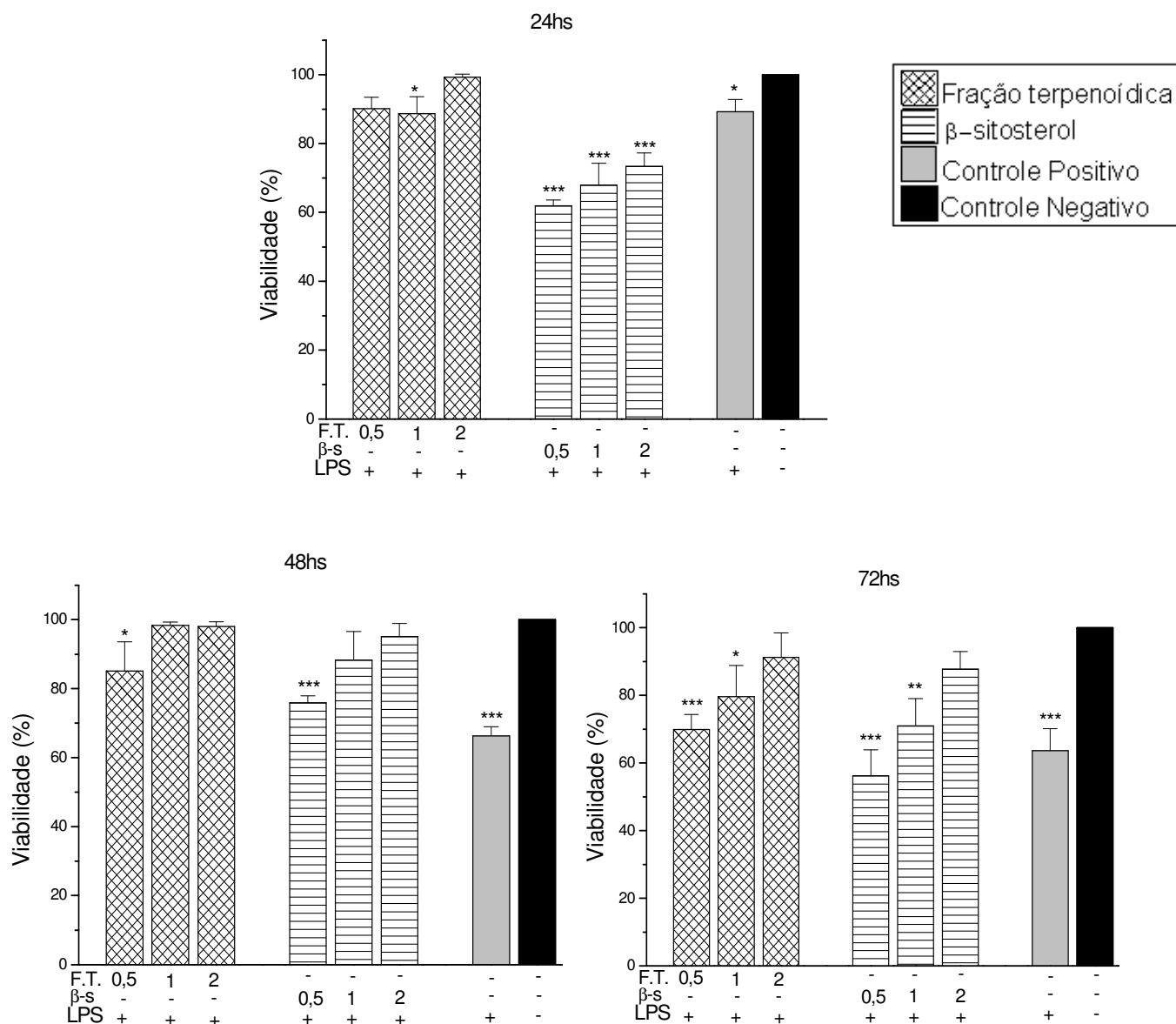


Figura 3: Viabilidade de macrófagos peritoneais frente à exposição de diferentes concentrações da fração terpenoídica e ao β-sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. Os macrófagos foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS, apenas LPS e somente células (Controle Negativo) por períodos de 24, 48 e 72 hs em estufa de CO₂ a 37°C. A viabilidade do controle negativo foi considerada 100%. Cada barra representa a média de 06 animais, sendo cada determinação ensaiada em triplicata. F.T. representa a fração terpenoídica e β-s representa β-sitosterol. As concentrações destas substâncias estão expressas em mg/mL.

***p<0,001 quando comparado ao controle negativo.

** p<0,01 quando comparado ao controle negativo.

* p<0,05 quando comparado ao controle negativo.

5.2 Deteminação da inibição da produção de óxido nítrico (NO)

Na Figura 4 e Tabela 1 podemos observar que houve uma intensa inibição da produção de NO pelos macrófagos peritoneais murinos em todos os tempos de incubação das amostras testadas. Esta inibição ocorreu de maneira dose-dependente e apresentou de maneira geral melhores resultados nos períodos de 24 e 48 hs, com inibições próximas a 100%. A fração terpenoídica apresentou maior atividade inibitória de NO quando comparada a substância β -sitosterol nos tempos de 48 e 72h.

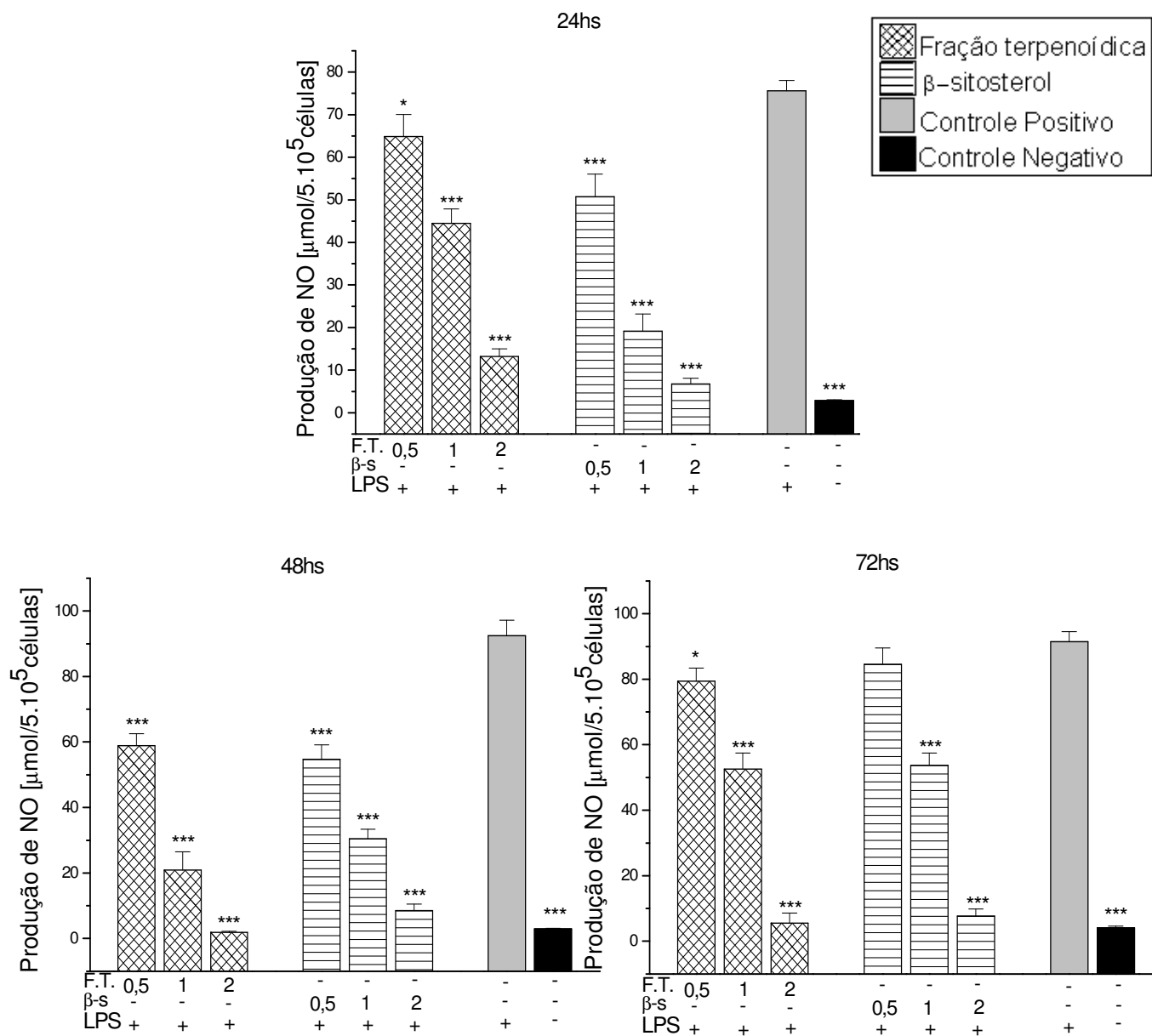


Figura 4: Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β-sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. Os macrófagos peritoneais foram incubados com as diferentes concentrações dos compostos + LPS (0,5 µg/mL), LPS (0,5 µg/mL) ou somente células, durante o período de 24, 48 e 72 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. A determinação desta citocina foi realizado através do ensaio de ELISA. Cada barra representa a média e desvio padrão de 06 animais, sendo que cada determinação foi realizada em triplicata. F.T. representa a fração terpenoídica e β-s representa β-sitosterol. As concentrações destas substâncias estão expressas em mg/mL.

***p<0,001 quando comparado ao LPS.

* p<0,05 quando comparado ao LPS.

Tabela 1: Produção de NO em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*, expressa em µmols/5x10⁵ células.

	0,5mg/mL	1mg/mL	2mg/mL	LPS	C-
<i>Fração T. - 24hs</i>	64,85 ± 5,2 (14, 17%)	44,42 ± 3,43 (41,21%)	13,17 ± 1,8 (82,57%)	75,56±2,41	2,90±0,13
<i>β-sitosterol - 24hs</i>	50,74 ± 5,31 (32,84%)	19,18 ± 3,98 (74,61%)	6,77 ± 1,34 (91,04%)	75,56±2,41	2,90±0,13
<i>Fração T. - 48hs</i>	58,85 ± 3,61 (36,33%)	20,94 ± 5,49 (77,34%)	1,91 ± 0,31 (97,93%)	92,43±4,79	2,90±0,27
<i>β-sitosterol - 48hs</i>	54,71 ± 4,42 (40,8%)	30,51 ± 2,82 (66,99%)	8,49 ± 2,02 (90,81%)	92,43±4,79	2,90±0,27
<i>Fração T. - 72hs</i>	79,40 ± 4,00 (13,12%)	52,54 ± 4,9 (42,51%)	5,54 ± 3,00 (93,94%)	91,40±3,13	4,09±0,55
<i>β-sitosterol - 72hs</i>	84,57 ± 4,99 (7,47%)	53,73 ± 3,68 (41,21%)	7,66 ± 2,19 (91,6%)	91,40±3,13	4,09±0,55

Avaliação após 24, 48 e 72hs horas de incubação. Cada valor representa a média ± desvio-padrão. O valor entre parênteses é igual a porcentagem de inibição quando comparado ao controle LPS. "Fração T." representa a fração terpenoídica. O experimento foi realizado com seis animais em triplicata.

5.3 Deteminação da inibição da produção da citocina TNF- α

Na Figura 5 e Tabela 2 podemos observar que houve uma significativa inibição da produção de TNF- α pelos macrófagos peritoneais murinos em todos os tempos de incubação e em todas as concentrações das amostras testadas, exceto na concentração 0,5 mg/mL da substância β -sitosterol, na incubação de 72 hs. Esta inibição ocorreu de maneira dose-dependente e apresentou melhores resultados no período de 48 hs, com inibição próxima a 100%, na concentração de 2mg/mL da fração terpenoídica. Esta fração terpenoídica apresentou de maneira geral uma maior atividade inibitória de TNF- α quando comparada à substância β -sitosterol nos três tempos de incubação.

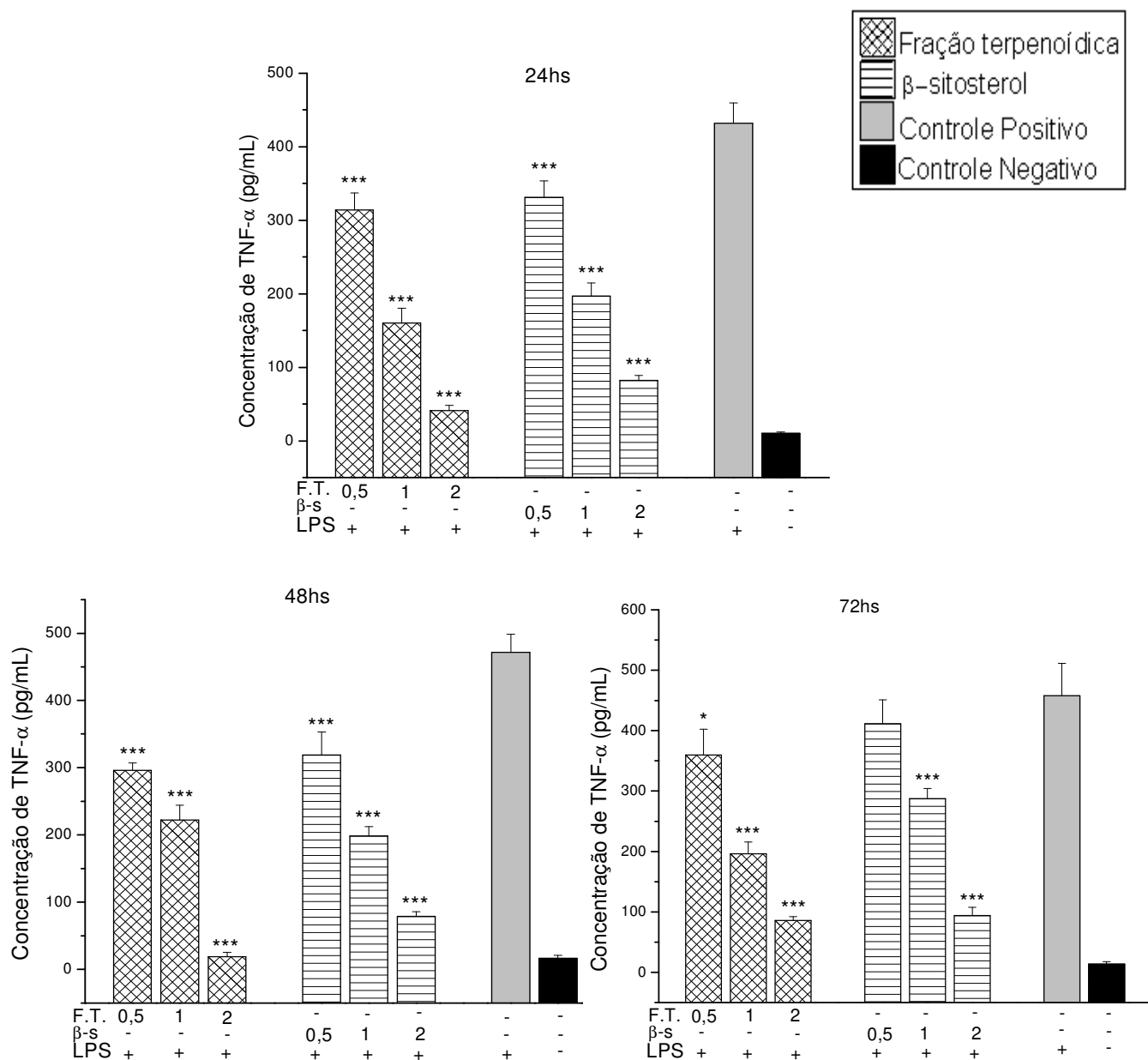


Figura 5– Concentração de TNF- α liberado por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à Fração terpenoídica e ao β -sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. Os macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram incubados em estufa de CO₂ (5%) a 37°C, por 24, 48 e 72 hs, em presença de várias concentrações dos compostos + LPS, apenas células (controle negativo) ou células + LPS (controle positivo). A determinação desta citocina foi realizado através do ensaio de ELISA. As concentrações de TNF- α foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TNF- α . Os resultados foram expressos em pg/mL, com média \pm desvio padrão de 6 animais. F.T. representa a fração terpenoídica e β -s representa β -sitosterol. As concentrações destas substâncias estão expressas em mg/mL.

*** p<0,001 quando comparado ao LPS.

*p<0,05 quando comparado ao LPS.

Tabela 2: Produção de TNF- α em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5 μ g/mL) e expostos à fração terpenoídica e à substância β -sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*, expressa em pg/mL.

	0.5mg/mL	1mg/mL	2mg/mL	LPS	C-
<i>Fração T. - 24hs</i>	314.11 \pm 23.14 (27,33%)	160.18 \pm 20.17 (62,94%)	41.06 \pm 7.03 (90,05%)	432.25 \pm 27.18	10.21 \pm 2.06
<i>β-sitosterol - 24hs</i>	331.11 \pm 22.42 (23,4%)	196.97 \pm 17.54 (54,54%)	82.25 \pm 6.78 (80,97%)	432.25 \pm 27.18	10.21 \pm 2.06
<i>Fração T. - 48hs</i>	295.88 \pm 11.10 (37,23%)	222.25 \pm 22.05 (52,85%)	18.90 \pm 6.42 (95,99%)	471.38 \pm 27.28	16.47 \pm 4.26
<i>β-sitosterol - 48hs</i>	319.07 \pm 34.01 (32,31%)	198.26 \pm 14.12 (57,94%)	78.90 \pm 6.94 (83,26%)	471.38 \pm 27.28	16.47 \pm 4.26
<i>Fração T. - 72hs</i>	359.84 \pm 42.95 (21,43%)	195.88 \pm 20.08 (57,23%)	85.91 \pm 6.51 (81,24%)	457.99 \pm 53.37	13.69 \pm 4.00
<i>β-sitosterol - 72hs</i>	411.59 \pm 39.28 (10,13%)	287.43 \pm 16.95 (37,24%)	94.20 \pm 13.47 (79,43%)	457.99 \pm 53.37	13.69 \pm 4.00

Avaliação após 24, 48 e 72hs horas de incubação. Cada valor representa a média \pm desvio-padrão. O valor entre parênteses é igual a porcentagem de inibição quando comparado ao controle LPS. "Fração T." representa a fração terpenoídica. O experimento foi realizado com seis animais em triplicata.

5.4 Determinação da inibição da produção da citocina IL-1

Na Figura 6 e Tabela 3 observamos uma significativa inibição da produção de IL-1 pelos macrófagos peritoneais murinos em todos os tempos de incubação e em todas as concentrações das amostras testadas, de maneira dose-dependente. Porém a maior inibição da produção desta citocina foi observada no período de 24 hs com valor de 78,62% (2mg/mL, fração terpenoídica) de inibição quando comparado ao controle positivo. Mais uma vez podemos observar que a fração terpenoídica possui melhor atividade inibitória quando comparada a substância β -sitosterol, em todos os tempos de incubação.

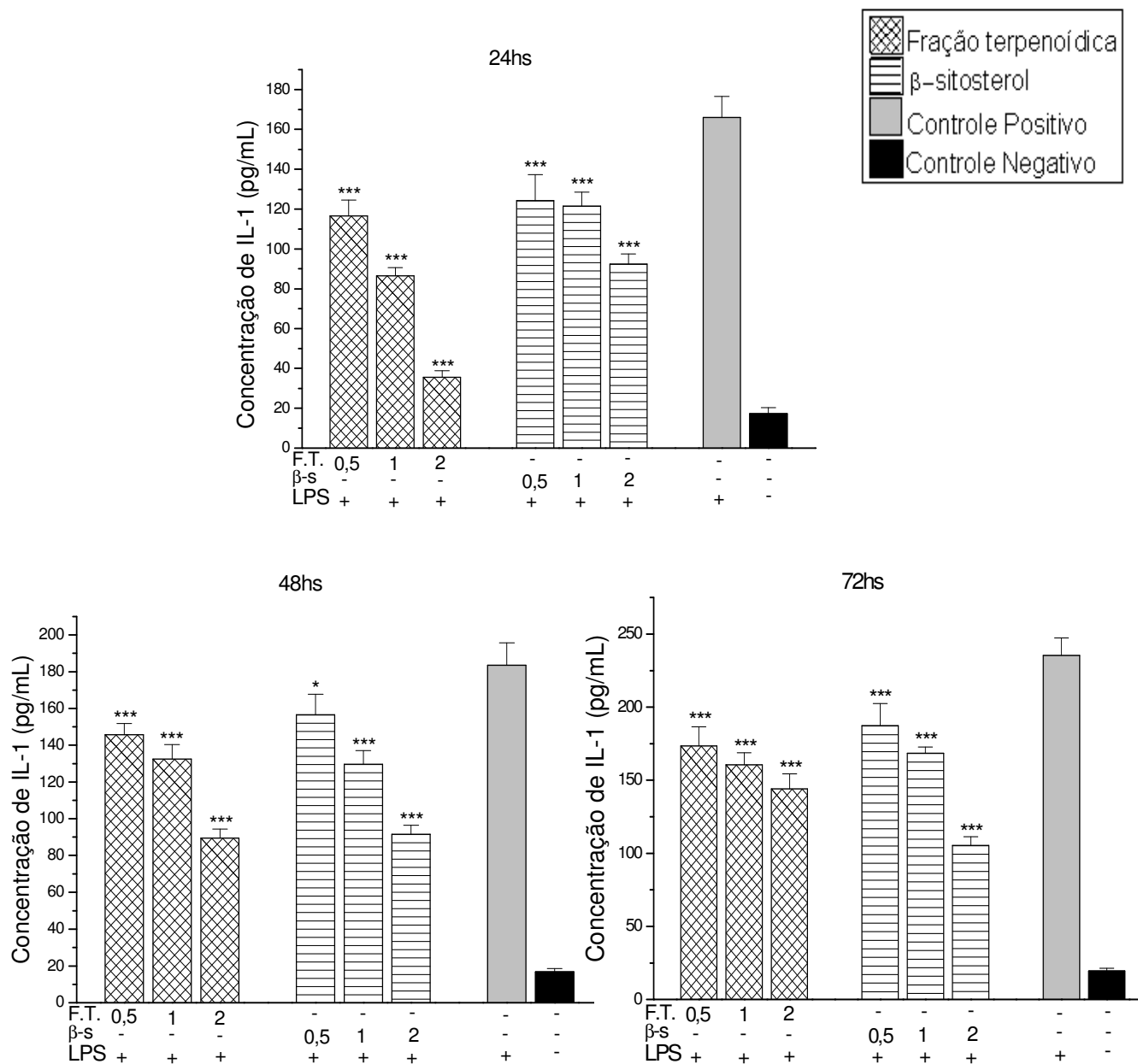


Figura 6– Concentração de IL-1 liberada por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β-sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. Os macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram incubados em estufa de CO₂ (5%) a 37^oC, por 24, 48 e 72 hs, em presença de várias concentrações dos compostos + LPS, apenas células (controle negativo) ou células + LPS (controle positivo). A determinação desta citocina foi realizado através do ensaio de ELISA. As concentrações de IL-1 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-1. Os resultados foram expressos em pg/mL, com média ± desvio padrão de 6 animais. F.T. representa a fração terpenoídica e β-s representa β-sitosterol. As concentrações destas substâncias estão expressas em mg/mL

*** p<0,001 quando comparado ao LPS.

* p<0,05 quando comparado ao LPS

Tabela 3: Produção de IL-1 em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*, expressa em pg/mL.

	0.5mg/mL	1mg/mL	2mg/mL	LPS	C-
<i>Fração A - 24hs</i>	116,47 ± 8,01 (29,87%)	86,57 ± 4,02 (47,87%)	35,50 ± 3,35 (78,62%)	166,08 ± 10,54	17,29 ± 2,98
<i>β-sitosterol - 24hs</i>	124,33 ± 2,94 (25,14%)	121,44 ± 7,16 (26,87%)	92,38 ± 5,04 (44,37%)	166,08 ± 10,54	17,29 ± 2,98
<i>Fração A - 48hs</i>	145,70 ± 6,05 (20,61%)	132,46 ± 7,84 (27,82%)	89,55 ± 4,87 (51,20%)	183,52 ± 12,17	16,78 ± 1,81
<i>β-sitosterol - 48hs</i>	156,59 ± 11,18 (14,67%)	129,73 ± 7,31 (29,31%)	91,52 ± 4,95 (50,13%)	183,52 ± 12,17	16,78 ± 1,81
<i>Fração A - 72hs</i>	173,43 ± 13,11 (26,31%)	160,54 ± 8,2 (31,78 %)	144,00 ± 10,45 (38,81%)	235,36 ± 12,00	19,38 ± 2,07
<i>β-sitosterol - 72hs</i>	187,32 ± 15,1 (20,41%)	168,53 ± 4,07 (28,39%)	105,43 ± 5,95 (55,5%)	235,36 ± 12,00	19,380 ± 2,07

Avaliação após 24, 48 e 72hs horas de incubação. Cada valor representa a média ± desvio-padrão. O valor entre parênteses é igual a porcentagem de inibição quando comparado ao controle LPS. "Fração T." representa a fração terpenoídica. O experimento foi realizado com seis animais em triplicata.

5.5 Determinação da inibição da produção da citocina IL-6

Analisando os resultados da inibição da produção de IL-6 podemos observar que não houve inibição da produção desta citocina pelas amostras testadas, em nenhum tempo de incubação (Figura 7, Tabela 4).

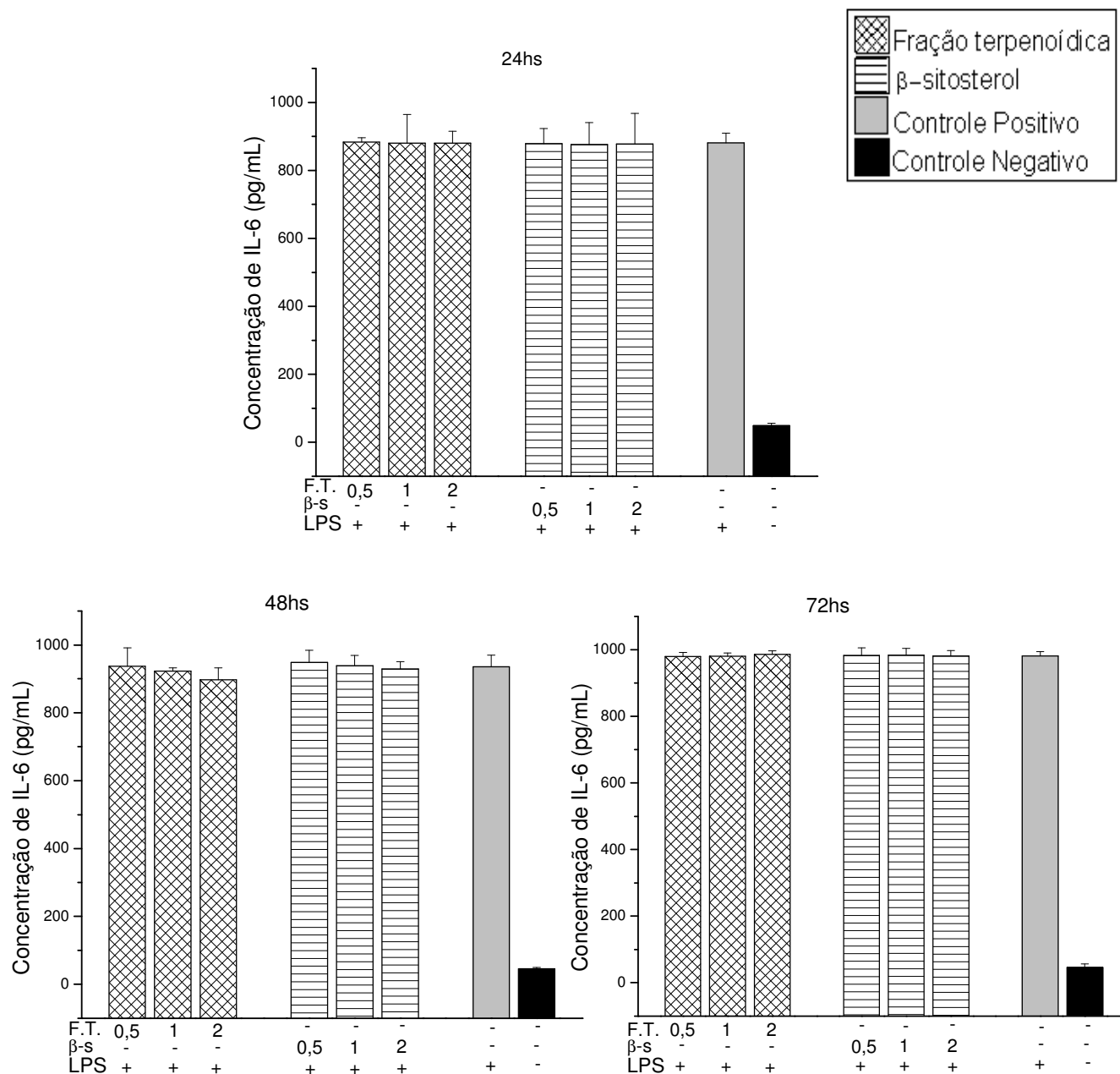


Figura 7– Concentração de IL-6 liberada por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β-sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. Os macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram incubados em estufa de CO₂ (5%) a 37^oC, por 24, 48 e 72 hs, em presença de várias concentrações dos compostos + LPS, apenas células (controle negativo) ou células + LPS (controle positivo). A determinação desta citocina foi realizado através do ensaio de ELISA. As concentrações de IL-6 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-6. Os resultados foram expressos em pg/mL, com média ±desvio padrão de 6 animais. F.T. representa a fração terpenoídica e β-s representa β-sitosterol. As concentrações destas substâncias estão expressas em mg/mL

Tabela 4: Produção de IL-6 em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, tidas a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*, expressa em pg/mL.

	0,5mg/mL	1mg/mL	2mg/mL	LPS	C-
<i>Fração T. - 24hs</i>	883,45 ± 13,01 (0%)	880,74 ± 133,62 (0)%	880,60 ± 34,32 (0)%	880,82 ± 29,09	48,680 ± 7,29
<i>β-sitosterol - 24hs</i>	879,23 ± 44,74 (0)%	876,78 ± 63,92 1% (0)%	877,75 ± 90,20 1% (0)%	880,82 ± 29,09	48,680 ± 7,29
<i>Fração T. - 48hs</i>	940,30 ± 77,711% (0)%	927,36 ± 45,24 (0)%	937,20 ± 120,141% (0)%	935,75 ± 33,80	45,525 ± 4,02
<i>β-sitosterol - 48hs</i>	961,16 ± 102,421% (0)%	938,62 ± 30,051% (0)%	929,17 ± 21,461% (0)%	935,75 ± 33,80	45,525 ± 4,02
<i>Fração T. - 72hs</i>	998,25 ± 147,08 1% (0)%	997,54 ± 53,531% (0)%	999,27 ± 125,281% (0)%	998,65 ± 98,91	46,045 ± 10,74
<i>β-sitosterol - 72hs</i>	1012,9 ± 48,201% (0)%	991,54 ± 62,941% (0)%	997,54 ± 99,651% (0)%	998,65 ± 98,91	46,045 10,74

Avaliação após 24, 48 e 72hs horas de incubação. Cada valor representa a média ± desvio-padrão. O valor entre parênteses é igual a porcentagem de inibição quando comparado ao controle LPS. "Fração T." representa a fração terpenoídica. O experimento foi realizado com seis animais em triplicata.

5.6 Determinação da inibição da produção da citocina IL-12

Os resultados referentes a inibição da produção da citocina IL-12 mostram que ocorreu uma expressiva inibição desta citocina em todos os tempos de incubação, por todas as amostras testadas (Figura 8 e Tabela 5). No entanto podemos observar que os tempos mais efetivos para a inibição foram os de 48 e 72 hs. A inibição da produção de IL-12 foi praticamente 100% no período de 48 hs, por todas as amostras testadas. Nos tempos de 24 e 72 hs observamos que os resultados foram dose-dependentes e que a fração terpenoídica apresentou maior atividade inibitória da produção desta citocina quando comparada a substância β -sitosterol.

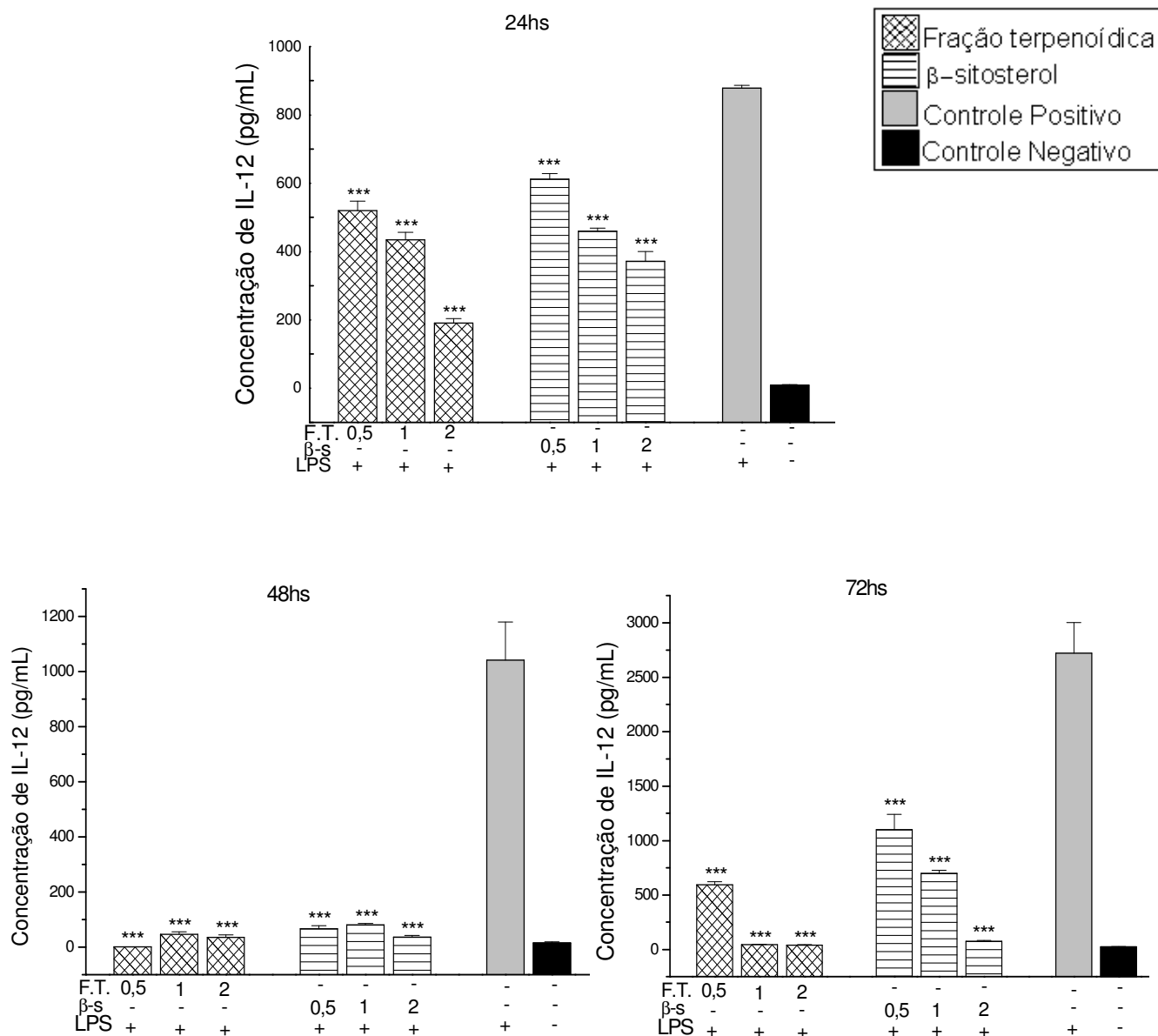


Figura 8– Concentração de IL-12 liberada por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β-sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. Os macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram incubados em estufa de CO₂ (5%) a 37°C, por 24, 48 e 72 hs, em presença de várias concentrações dos compostos + LPS, apenas células (controle negativo) ou células + LPS (controle positivo). A determinação desta citocina foi realizado através do ensaio de ELISA. As concentrações de IL-12 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-12. Os resultados foram expressos em pg/mL, com média ± desvio padrão de 6 animais. F.T. representa a fração terpenoídica e β-s representa β-sitosterol. As concentrações destas substâncias estão expressas em mg/mL

*** p<0,001 quando comparado ao LPS.

Tabela 5: Produção de IL-12 em macrófagos peritoneais ativados com LPS (0,5µg/mL) e expostos à fração terpenoídica e à substância β-sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*, expressa em pg/mL.

	0,5mg/mL	1mg/mL	2mg/mL	LPS	C-
Fração T. - 24hs	519,44 ± 28,58 (40,08%)	434,29 ± 22,12 (50,00%)	190,55 ± 13,12 (78,31%)	878,70 ± 8,19	9,36 ± 1,14
β-sitosterol - 24hs	612,35 ± 15,94 (30,31%)	459,17 ± 9,83 (47,74%)	371,36 ± 29,05 (57,73%)	878,70 ± 8,19	9,36 ± 1,14
Fração T. - 48hs	0,44 ± 0,14 (99,95%)	46,37 ± 8,56 (95,54%)	35,46 ± 8,64 (96,59%)	1041,3 ± 138,21	15,40 ± 4,31
β-sitosterol - 48hs	66,26 ± 11,23 (93,63%)	80,41 ± 5,42 (92,27%)	36,70 ± 5,55 (96,47%)	1041,3 ± 138,21	15,40 ± 4,31
Fração T. - 72hs	595,10 ± 28,12 (78,14%)	43,39 ± 5,45 (98,4%)	40,78 ± 4,53 (98,50%)	2722,4 ± 279,46	24,58 ± 3,19
β-sitosterol - 72hs	1101,0 ± 138,09 (59,55%)	699,40 ± 29,49 (74,30%)	75,46 ± 10,06 (97,22%)	2722,4 ± 279,46	24,58 ± 3,19

A valiação após 24, 48 e 72hs horas de incubação. Cada valor representa a média ± desvio-padrão. O valor entre parênteses é igual a porcentagem de inibição quando comparado ao controle LPS. "Fração T." representa a fração terpenoídica. O experimento foi realizado com seis animais em triplicata.

5.7 Determinação da produção da citocina IL-10

Na Figura 9 e Tabela 6 é possível observar uma intensa produção da citocina IL-10, de maneira dose-dependente. A fração terpenoídica apresentou melhor atividade estimulatória da produção desta citocina, com valores próximos ao controle positivo. De maneira geral os melhores resultados foram encontrados nos períodos de 24 e 72 hs.

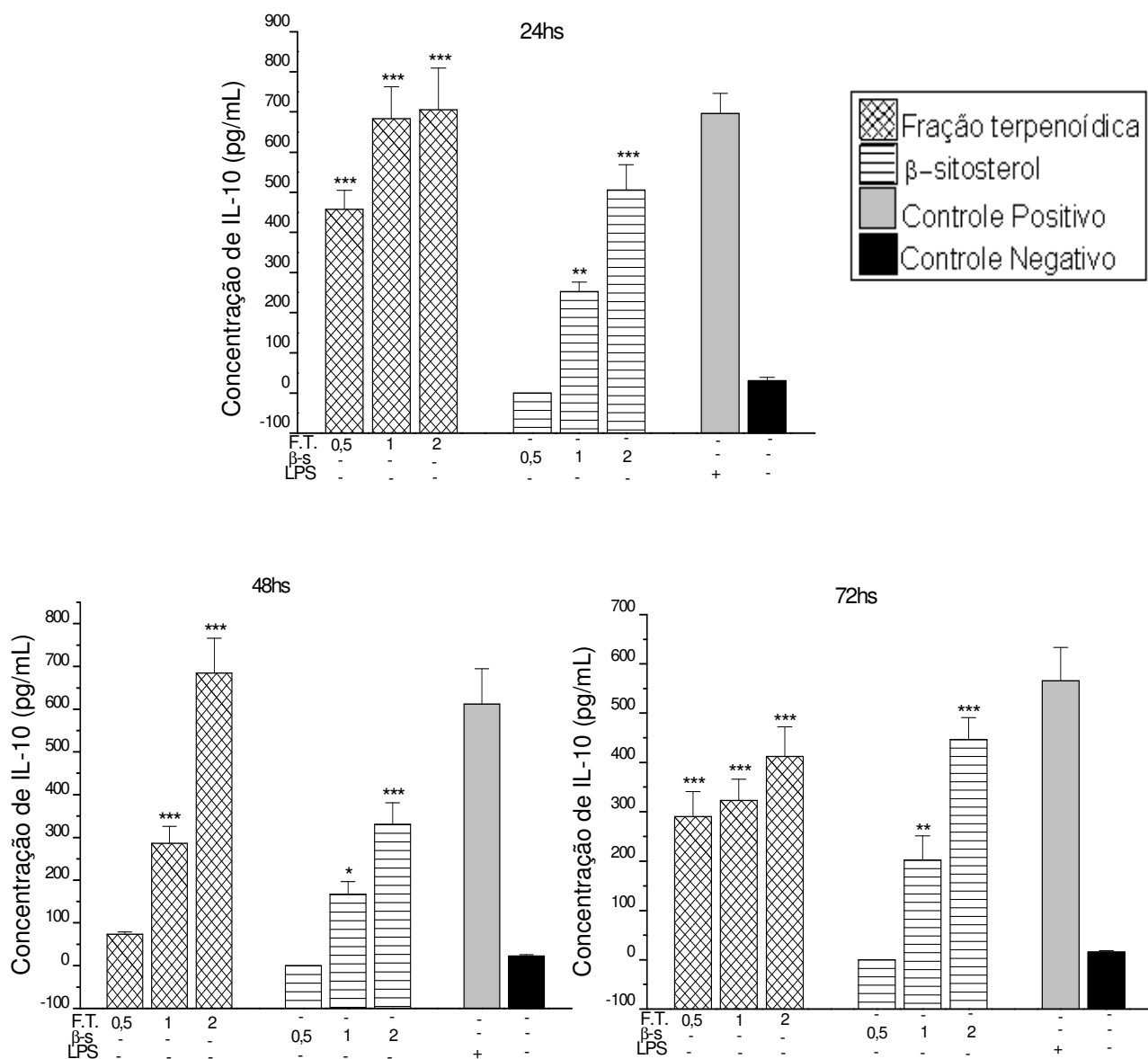


Figura 9– Concentração de IL-10 liberada por macrófagos peritoneais expostos à fração terpenoídica e ao β-sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. Os macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram incubados em estufa de CO₂ (5%) a 37^oC, por 24, 48 e 72 hs, em presença de diferentes concentrações dos compostos, apenas células (controle negativo) ou células + LPS (controle positivo). A determinação desta citocina foi realizado através do ensaio de ELISA. As concentrações de IL-10 foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IL-10. Os resultados foram expressos em pg/mL, com média ± desvio padrão de 6 animais. F.T. representa a fração terpenoídica e β-s representa β-sitosterol. As concentrações destas substâncias estão expressas em mg/mL.

***p<0,001 quando comparado ao controle negativo.

** p<0,01 quando comparado ao controle negativo.

* p<0,05 quando comparado ao controle negativo.

Tabela 6: Produção de IL-10 em macrófagos peritoneais expostos à fração terpenoídica e à substância β -sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*, expressa em pg/mL.

	0,5mg/ml	1mg/ml	2mg/ml	LPS	C-
<i>Fração T. - 24hs</i>	457,85 \pm 47,20	682,98 \pm 80,00	705,47 \pm 104,00	695,78 \pm 50,53	30,503 \pm 8,16
<i>b-sitosterol - 24hs</i>	0,000 \pm 0,000	252,81 \pm 23,84	505,18 \pm 63,24	695,78 \pm 50,53	30,503 \pm 8,16
<i>Fração T. - 48hs</i>	73,550 \pm 5,15	285,74 \pm 39,97	684,60 \pm 81,57	611,79 \pm 82,32	21,893 \pm 3,62
<i>b-sitosterol - 48hs</i>	0,000 \pm 0,000	166,86 \pm 30,13	330,56 \pm 50,06	611,79 \pm 82,32	21,893 \pm 3,62
<i>Fração T. - 72hs</i>	290,12 \pm 50,69	322,84 \pm 43,38	412,39 \pm 60,23	565,61 \pm 67,64	15,437 \pm 3,07
<i>b-sitosterol - 72hs</i>	0,000 \pm 0,00	201,90 \pm 49,19	446,59 \pm 44,34	565,61 \pm 67,64	15,437 \pm 3,07

Avaliação após 24, 48 e 72hs horas de incubação. Cada valor representa a média \pm desvio-padrão. "Fração T." representa a fração terpenoídica. O experimento foi realizado com seis animais em triplicata.

5.8 Determinação do fator de transcrição NF- κ B

Os resultados referentes a quantificação de NF- κ B mostraram uma moderada diminuição da concentração deste fator de transcrição nuclear, principalmente quando a concentração 2mg/mL da fração terpenoídica estava presente (Figura 10 e Tabela 7). Os resultados mostraram que quanto maior é a concentração das amostras testadas, menor é a concentração de NF- κ B presente na fração nuclear dos macrófagos peritoneias. O resultado mais significativo foi no período de 48 hs, fração terpenoídica, concentração 2mg/mL, apresentando 32,44% de inibição da produção de NF- κ B quando comparado ao controle positivo LPS.

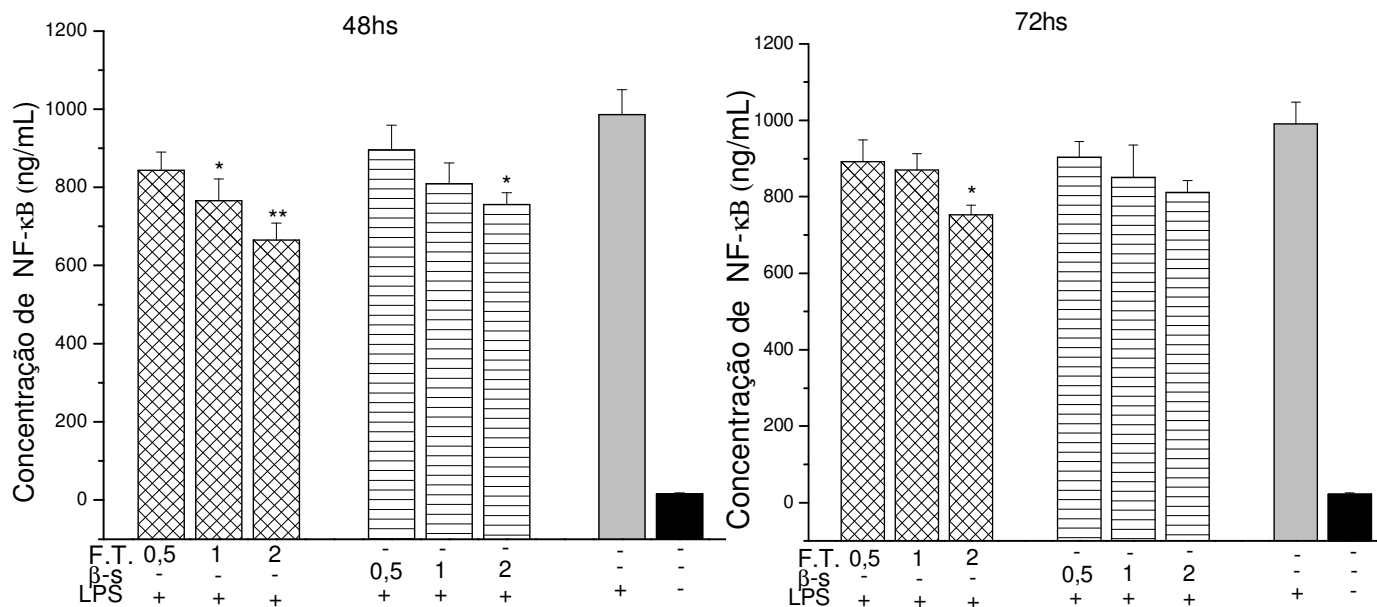
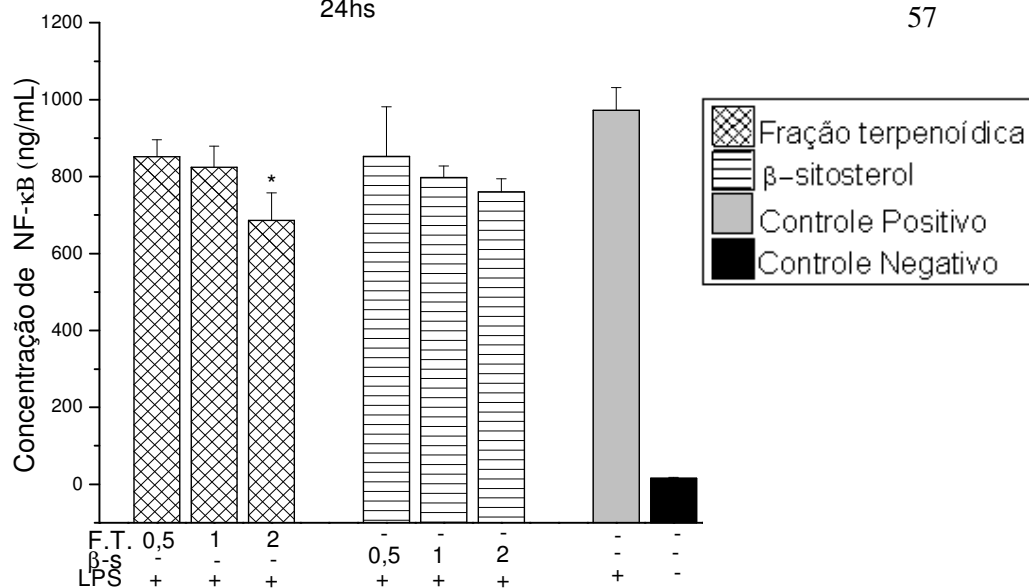


Figura 10– Concentração de NF-κB presente na fração nuclear de macrófagos peritoneais estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e ao β-sitosterol, obtidos a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*. Os macrófagos peritoneais de camundongos Swiss foram incubados em estufa de CO₂ (5%) a 37⁰C, por 24, 48 e 72 hs, em presença de várias concentrações dos compostos + LPS, apenas células (controle negativo) ou células + LPS (controle positivo). Após este período foram realizadas a extração da fração nuclear e consecutivamente o ensaio de ELISA. As concentrações de NF-κB foram calculadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de p65. Os resultados foram expressos em ng/mL, com média ± desvio padrão de 6 animais. F.T. representa a fração terpenoídica e β-s representa β-sitosterol. As concentrações destas substâncias estão expressas em mg/mL.

** p<0,01 quando comparado ao LPS.

* p<0,05 quando comparado ao LPS.

Tabela 7: Determinação de NF- κ B em macrófagos peritoneais ativados com o estimulante LPS (0,5 μ g/mL) expostos à fração terpenoídica e à substância β -sitosterol, obtidas a partir do extrato clorofórmico de *Qualea multiflora*, expressa em ng/mL.

	0,5mg/mL	1mg/mL	2mg/mL	LPS	Controle negativo
Fração T. - 24hs	851,31 \pm 43,91 (12,4%)	824,25 \pm 55,15 (15,19%)	685,93 \pm 72,04 (29,42%)	971,92 \pm 58,92	15,55 \pm 3,25
β-sitosterol - 24hs	851,96 \pm 129,28 (12,34%)	797,10 \pm 30,91 (17,98 %)	760,77 \pm 33,31 (21,27%)	971,92 \pm 58,92	15,55 \pm 3,25
Fração T. - 48hs	843,40 \pm 46,87 (14,40%)	765,72 \pm 56,20 (22,28%)	665,65 \pm 43,36 (32,44%)	985,30 \pm 63,98	15,61 \pm 2,87
β-sitosterol - 48hs	895,86 \pm 63,10 (9,07 %)	809,55 \pm 52,92 (17,83%)	756,10 \pm 30,08 (23,26%)	985,30 \pm 63,98	15,61 \pm 2,87
Fração T. - 72hs	891,67 \pm 57,19 (9,97%)	869,98 \pm 42,58 (12,16%)	752,64 \pm 25,39 (24,01%)	990,46 \pm 56,87	21,97 \pm 3,86
β-sitosterol - 72hs	902,90 \pm 41,49 (8,84%)	850,38 \pm 84,66 (14,14%)	811,78 \pm 30,22 (18,04%)	990,46 \pm 56,87	21,97 \pm 3,86

Avaliação após 24, 48 e 72hs horas de incubação. Cada valor representa a média \pm desvio-padrão / % de inibição quando comparado ao controle LPS. “Fração T.” representa a fração terpenoídica. O experimento foi realizado com seis animais em triplicata.

5.9 Determinação da atividade citotóxica em linhagens tumorais

Analisando os valores de IC₅₀ (concentração responsável pela morte de 50% das células tumorais) podemos observar que a fração terpenoídica e a substância β-sitosterol apresentaram valores acima dos verificados pela droga padrão Taxol[®], em ambas as linhagens tumorais (Tabela 8). No entanto, se compararmos a viabilidade dos macrófagos peritoneais com a viabilidade das linhagem tumorais LM3 e LP07, em concentrações mais elevadas (2 e 1 mg/mL), podemos observar que as amostras testadas não apresentaram efeito citotóxico para os macrófagos mas se mostraram extremamente tóxicas para as linhagens celulares estudadas (Tabela 9). Este efeito citotóxico seletivo é extremamente desejado em drogas antineoplásicas e sugere um futuro promissor destas substâncias no combate a certos tipos de câncer.

Tabela 8: Valores de IC₅₀ (mg/mL) para as linhagens celulares LM3 e LP07 após 24h de incubação.

	LM3	LP07
Fração terpenoídica	0,310	0,276
β- sitosterol	0,270	0,199
Taxol [®]	0,184	0,121

Tabela 9: Viabilidade celular nas culturas celulares no período de 24 hs

	Macrófagos Peritoneais	LM3	LP07
F.terpenoídica(2mg/mL)	99,25%	0%	0%
F.terpenoídica(1 mg/mL)	88,68%	8,32%	12,48%
F.terpenoídica(0,5 g/mL)	90,10%	34,34%	32,65%
β-sitosterol (2 mg/mL)	73,34%	0%	0%
β-sitosterol (1 mg/mL)	67,90%	1,56%	3,71%
β-sitosterol (0,5 mg/mL)	61,87%	28,98%	20,54%
Controle negativo	100%	100%	100%

6. DISCUSSÃO

O uso de plantas como medicamento tem aumentado dia a dia em todo o mundo e essa realidade também é bastante visível no Brasil. Por diversos motivos, sejam de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica, as plantas medicinais têm sido opção terapêutica para uma parcela crescente da população brasileira, rural ou urbana que utiliza medicamentos produzidos pelas indústrias farmacêuticas, fitoterápicos produzidos por centenas de entidades e organizações não governamentais, programas de prefeituras municipais e governos estaduais.

Nos últimos vinte anos no Brasil, país com a maior diversidade vegetal do mundo (PLOTKIN, 1991; BRASIL, 1998), o número de estudos sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (BRITO e BRITO 1993). Isso mostra que em um país biologicamente tão rico, mas com ecossistemas tão ameaçados, pesquisas com plantas medicinais devem ser incentivadas. Afinal, elas poderiam levar à reorganização das estruturas de uso dos recursos naturais (em vista da necessidade de sua extração estar associada aos planos de manejo) e à elevação do PIB, visto que há grande tendência mundial de aumento na utilização de fitoterápicos.

Em colaboração a estes estudos, no presente trabalho foram realizados ensaios para determinar a atividade antiinflamatória e antitumoral da fração terpenoídica e do β -sitosterol obtidos a partir da planta *Q. multiflora*. A partir de dados coletados com a população rural do cerrado, relacionados ao uso empírico desta planta como antiinflamatório foi possível direcionar o estudo para o provável efeito terapêutico. Alguns estudos indicam que quando a seleção da planta é realizada através da observação do uso popular, as possibilidades de sucesso da pesquisa são maiores (TROTTER et al., 1982; ELISABETSKY e WANNMACHER, 1993).

Para iniciar o estudo do efeito de *Q. multiflora* sobre o sistema imunológico foi necessário determinar a toxicidade destas substâncias sobre os macrófagos peritoneais murinos. Isto porque após as células serem retiradas de seu ambiente natural para utilização *in vitro*, as mesmas encontram-se fragilizadas e a garantia de sua viabilidade é fundamental para a análise de seu comportamento frente a estímulos (FRESHNEY, 1994). Para tanto foram realizados ensaios de citotoxicidade nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 hs. Na Figura 3 foi possível observar que a fração terpenoídica e a substância β -sitosterol apresentaram pouco efeito citotóxico sobre os macrófagos estimulados com LPS, sendo que o β -sitosterol apresentou maior efeito tóxico quando comparado à fração terpenoídica.

No tempo de 24h a viabilidade variou de 61,87% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 99,25% (2mg/mL, fração terpenoídica). Em 48h de incubação a viabilidade apresentou variabilidade de 75,8% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 97,98% (2mg/mL, fração terpenoídica). De maneira semelhante, durante a incubação de 72h houve uma variação da viabilidade de 56,18% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 91,23% (2mg/mL, fração terpenoídica). Estes resultados mostram que invariavelmente, em todos os tempos de incubação, a concentração 0,5mg/mL de β -sitosterol apresentou maior citotoxicidade e a concentração 2mg/mL da fração terpenoídica apresentou os menores efeitos tóxicos sobre os macrófagos peritoneais murinos. Estes resultados são intrigantes considerando que SEMPRE a menor concentração utilizada foi mais tóxica contrariando resultados normalmente observados em ensaios de viabilidade celular. A partir das concentrações que observamos viabilidade acima de 50% nos ensaios de citotoxicidade, realizamos os ensaios imunológicos *in vitro* nos mesmos períodos de incubação de 24, 48 e 72 hs.

Para avaliar a atividade de plantas sobre a imunidade inata é comum a utilização de ensaios para a determinação de intermediários reativos do nitrogênio como o NO. A determinação da inibição da produção destes intermediários é realizada através da estimulação de macrófagos por LPS e/ou IFN- γ . Esta ativação de macrófagos por LPS, o principal componente da parede celular de bactérias gram negativas, resulta na liberação de diversos mediadores, tais como NO e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12. (SCHIMMER and PARKER, 2001; BENSINGER e TONTONZOZ, 2008).

O NO é uma molécula reativa produzida a partir de um nitrogênio guanidínico presente na enzima NO sintase induzível (iNOS) que se encontra altamente expressa em macrófagos ativados com LPS (NATHAN, 1992; BENSINGER e TONTONZOZ, 2008). A produção normal ou fisiológica de NO por fagócitos é benéfica para a defesa do hospedeiro contra microrganismos e parasitas, no entanto a superprodução de NO pode ser prejudicial e resultar em processos inflamatórios crônicos e agudos, além de atualmente ser relacionada com a promoção de angiogênese tumoral e metástase (THIEMERMANN and VANE, 1990; BOGDAN, 1998; CHEN e STONER, 2004). Em tumores de mama, inibidores da iNOS vem sendo utilizados na prevenção da angiogênese e além disto, a terapia para prevenção de metástases no câncer pode ser acompanhada pela inativação da iNOS (XIE and FIDLER, 1998; JADESKI and LALA, 1999).

Contudo, a determinação da inibição de NO foi realizada neste trabalho através da estimulação dos macrófagos com LPS. Os resultados mostraram que as amostras testadas

apresentaram um expressivo efeito inibitório da produção deste mediador inflamatório de maneira dose-dependente (Figura 4, Tabela 1). No período de 24 hs, observamos que a substância isolada β -sitosterol apresentou melhor efeito inibitório da produção de NO quando comparada a fração terpenoídica. Neste tempo de incubação houve uma variação de 14,17% (0,5mg/mL, fração terpenoídica) a 91,04% (2mg/mL, β -sitosterol) de inibição quando comparado ao controle positivo LPS.

Por outro lado, nos tempos de incubação de 48 e 72 hs a fração terpenoídica apresentou de maneira geral melhores efeitos inibitórios sobre este mediador, quando comparada à substância isolada β -sitosterol. O período de 48 hs foi o que apresentou melhores resultados, mostrando inibição variando de 36,33%(0,5mg/mL) a 97,93% (2mg/mL), ambos resultados pertencentes a fração terpenoídica. Quando analisamos o tempo de 72 hs pudemos observar uma variação de 7,47% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 93,94% (2mg/mL, fração terpenoídica) de inibição de NO quando comparado ao controle positivo LPS. Analisando estatisticamente todos os resultados referentes à inibição deste mediador por todas as concentrações das substâncias testadas, observamos que todas as amostras apresentaram $p < 0,001$ quando comparadas ao LPS, exceto a concentração de 0,5mg/mL de β -sitosterol no período de 72 hs e 0,5mg/mL pertencente a fração terpenoídica, nos períodos de 24 e 72 hs ($p < 0,05$).

A estimulação da produção de NO em macrófagos através da expressão de iNOS é realizada por citocinas como TNF- α , IL-1, IFN- γ (CARLOS et al., 2004). O NO e TNF- α possuem importantes papéis na patogênese de várias doenças durante a inflamação aguda (NATHAN, 1992). Além disto, TNF- α atua como um fator de progressão de tumores através da modulação da motilidade tumoral ou pelo aumento da expressão de moléculas de adesão em órgãos alvos (GELIN et al.,1991; KUNDU, 2008). Portanto, a identificação de novos agentes farmacológicos que possam prevenir a superprodução de NO e TNF- α é de considerável interesse médico (MANJEET e GHOSH, 1999; CARLI et al., 2009).

Na Figura 5 e Tabela 2, observamos uma significativa inibição da produção de TNF- α por todas as amostras testadas e em todas as concentrações de maneira dose-dependente. Além disso, pudemos observar que a fração terpenoídica apresentou melhores resultados quando comparada ao β -sitosterol em todos os períodos de incubação e em todas as concentrações testadas exceto na concentração de 1mg/mL no período de 48 hs.

Em 24 hs de incubação houve uma variação da porcentagem de inibição de TNF- α de 23,4% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 90,05% (2mg/mL, fração terpenoídica) quando

comparadas ao LPS. De maneira semelhante aos resultados encontrados na determinação de NO, observamos que o período de 48 hs apresentou os resultados mais expressivos de inibição da produção de TNF- α , com valores variando de 32,31% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 95,99% (2mg/mL, fração terpenoídica). Por outro lado, o período de incubação de 72 hs apresentou os resultados menos significativos para a inibição da produção desta citocina, variando de 10,13% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 81,24% (2mg/mL, fração terpenoídica) de inibição da produção de TNF- α . Ainda neste tempo de incubação, pudemos observar que a concentração 0,5mg/mL de ambas as amostras testadas apresentaram pouca ($p < 0,05$) ou nenhuma diferença estatística quando comparado ao controle positivo LPS. De maneira oposta, todos os outros resultados dos diferentes períodos de incubação apresentaram $p < 0,001$ em relação ao LPS.

De maneira semelhante ao TNF- α , a IL-1 atua na estimulação de macrófagos. A secreção de IL-1 por macrófagos tem a função de ativar a cascata pró-inflamatória, incluindo a liberação de NO, TNF- α , IL-12 e IL-6. A produção descontrolada de IL-1 é uma característica das desordens auto-imunes e influencia a severidade destas doenças (DINARELLO, 1991; BIOQUE et al., 1995). Além do mais a IL-1 estimula a expressão de potentes fatores angiogênicos estimulando a neovascularização tumoral (TORISU et al., 2000; NAKAO et al., 2005).

Em relação a inibição da produção de IL-1 pelos macrófagos estimulados com LPS, pudemos observar que a produção desta citocina foi fortemente inibida, na presença das amostras testadas, de maneira dose-dependente (Figura 6 e Tabela 3). De maneira geral, a fração terpenoídica apresentou melhor atividade inibitória quando comparada ao β -sitosterol, exceto na concentração de 1mg/mL no período de 48 hs e 2mg/mL no tempo de 72 hs.

Em 24 hs de incubação houve uma variação da porcentagem de inibição da produção de IL-1 de 25,14% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 78,62% (2mg/mL, fração terpenoídica). Este período mostrou-se claramente o mais efetivo para a inibição da produção de IL-1 pela fração terpenoídica, no entanto, quando observamos a inibição ocasionada pela presença de β -sitosterol não encontramos um tempo melhor de incubação, pois cada concentração induz uma melhor inibição de IL-1 em períodos de incubação diferentes.

Analisando o tempo de 48 hs verificamos que de maneira geral este é o menos efetivo para a inibição desta citocina, com valores variando de 14,67% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 51,20% (2mg/mL, fração terpenoídica). Por outro lado, o período de 72 hs apresentou variação dos valores de porcentagem de inibição de IL-1, com variações de 20,41% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 55,5% (2mg/mL, β -sitosterol). De maneira semelhante

aos resultados dos outros mediadores citados acima, todos os resultados referentes às concentrações das amostras testadas apresentaram diferença estatística de $p < 0,001$ quando comparadas ao controle positivo LPS, exceto a concentração $0,5 \text{ mg/mL}$ de β -sitosterol no período de 48 hs ($p < 0,05$).

Quando uma resposta inflamatória aguda é ativada, a cascata de produção de citocinas pró-inflamatórias é iniciada com a produção imediata de IL-1 e TNF- α . Estas citocinas estimulam a liberação de IL-6 que realiza um importante papel iniciando a reação hepática de fase aguda (LUSTER et al., 1994; NAUGLER et al., 2007). Estudos mostram que a IL-6 e outras citocinas apresentam um importante papel na inibição da produção de TNF- α *in vitro* e *in vivo* (ADERKA et al., 1989).

Deste modo, analisando a produção de IL-6 neste estudo, verificamos que a inibição da produção desta citocina não foi alterada pela presença das amostras testadas, ou seja, não houve inibição significativa da produção de IL-6 em nenhum período de incubação e em nenhuma concentração das substâncias testadas (Figura 7 e Tabela 4). Estes resultados sugerem que a inibição da produção de outras moléculas pró-inflamatórias observada neste trabalho ocorrem através de diferentes vias de sinalização da produção de IL-6.

De modo semelhante às citocinas já descritas, a interleucina-12 (IL-12) é uma citocina produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno em resposta a estimulação por uma série de microrganismos e seus produtos. Esta molécula desempenha um papel crítico na determinação da natureza da resposta imune a antígenos endógenos ou exógenos, direcionando o sistema imunológico a uma resposta Th₁ ou Th₂. Por este motivo esta citocina pode ser um alvo ideal para a modulação da resposta imune durante o processo de doenças auto-imunes (BARNES, 2003; MARKIEWICZ et al., 2009). A mesma, possui diversas atividades biológicas, principalmente através de linfócitos T e células NK, induzindo a produção de IFN- γ (HOLSCHER et al., 2004). Sendo o IFN- γ um potente estimulador de macrófagos, a IL-12 atua indiretamente na ativação deste fagócito. Portanto a determinação desta citocina é essencial para o esclarecimento das vias de modulação da resposta imune inata.

Na Figura 8 e Tabela 5, podemos observar a produção de IL-12 por macrófagos estimulados com LPS e expostos à fração terpenoídica e a substância β -sitosterol nos períodos de incubação de 24, 48 e 72 hs. Verificamos que houve uma intensa inibição da produção desta citocina, em todos os tempos de incubação e por todas as amostras testadas, no entanto, esta inibição foi mais acentuada nos períodos de 48 e 72 hs. Além disto, observamos de

maneira geral, que a atividade inibitória de IL-12 foi mais efetiva pela fração terpenoídica que quando comparada ao β -sitosterol, em todos os tempos de incubação.

Apesar de menos efetivo, o período de incubação de 24 hs também apresentou significativos resultados da inibição desta citocina, variando de 30,31% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 78,31% (2mg/mL, fração terpenoídica), com resposta dose-dependente. Por outro lado, o período de 48 hs apresentou melhores resultados, com inibições próximas a 100%, por todas as amostras testadas, com variação de 92,27% (1mg/mL, β -sitosterol) a 99,95% (0,5mg/mL, fração terpenoídica) de inibição quando comparadas aos LPS. De maneira semelhante a este último período, o tempo de 72 hs também apresentou inibições próximas a 100%, variando de 59,55% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 98,50% (2mg/mL, fração terpenoídica). Analisando estatisticamente todos os resultados referentes a inibição desta citocina, observamos que todas as amostras testadas apresentaram $p < 0,001$ quando comparadas ao LPS.

Considerando que de maneira oposta ao NO e a todas as citocinas citadas acima, a IL-10 apresenta características antiinflamatórias através da inibição da ativação dos macrófagos (SPITS e MALEFTY, 1992; NAUNDORF et al., 2009), procurou-se neste trabalho determinar se este mediador era produzido em presença da fração terpenica e da substância pura β -sitosterol por nós testadas.

Nossos resultados mostram uma expressiva produção de IL-10 em macrófagos não estimulados por LPS e expostos a diferentes concentrações da fração terpenoídica e de β -sitosterol (Figura 9, Tabela 6), alcançando resultados semelhantes ao controle positivo. Se compararmos a efetividade dos três tempos de incubação, verificamos que os períodos de 24 e 72 hs apresentaram, de maneira geral, melhores resultados para a estimulação da produção desta citocina. Esta produção foi de maneira dose-dependente e se mostrou mais expressiva quando estimulada pela fração terpenoídica em todos os tempos de incubação exceto na concentração 2mg/mL do período de 72 hs. Por outro lado a concentração de 0,5mg/mL de β -sitosterol não apresentou atividade estimulatória da produção de IL-10 em nenhum período analisado.

Em 24 hs de incubação, houve uma variação da concentração desta citocina desde a ausência de produção da mesma (0,5mg/mL, β -sitosterol) a $705,47 \pm 104,00$ pg/mL (2mg/mL, fração terpenoídica), destacando que esta última concentração estimulou mais a produção de IL-10 que quando comparada a produção realizada pelo estimulante padrão LPS ($695,78 \pm 50,53$ pg/mL).

No período de 48 hs observamos que os resultados referentes a produção desta citocina, variaram da ausência de produção (0,5mg/mL, β -sitosterol) a $684,60 \pm 81,57$ pg/mL (2mg/mL, fração terpenoídica). De maneira semelhante aos resultados do período de 24 hs, observamos que a concentração 2mg/mL pertencente a fração terpenoídica, apresentou-se mais efetiva para a estimulação de IL-10 que o estimulante padrão LPS ($611,79 \pm 82,32$ pg/mL). Analisando os resultados referentes a incubação de 72 hs, podemos observar que os valores das concentrações de IL-12 estimulados pelas amostras testadas também variaram desde a ausência de produção (0,5mg/mL, β -sitosterol) até $446,59 \pm 44,34$ pg/mL (2 mg/mL, β -sitosterol).

Em macrófagos, o fator nuclear NF- κ B em cooperação com outros fatores de transcrição, coordenam a expressão de genes codificadores de iNOS. Além disso, o NF- κ B desempenha uma papel crítico na ativação das células imunológicas através da regulação positiva de muitas citocinas essenciais ao sistema imune (GHOSH et al., 1998; KARIN, 2006). Atualmente tem sido relacionado a ativação deste fator de transcrição em diversos tipos de cânceres, promovendo a progressão e angiogênese tumoral (KARIN, 2006; WATARI et al., 2008). Um grande número de compostos naturais parece interferir com a cascata que leva à ativação do NF- κ B. O efeito de muitos extratos brutos obtidos de fontes naturais pode ser agora explicado baseando-se no fato de que estas plantas contêm agentes reguladores do NF- κ B, como diterpenóides e as lactonas sesquiterpênicas (PALLADINO et al., 2003).

Por este motivo, é muito importante para o direcionamento do provável mecanismo de ação de drogas antiinflamatórias, determinar o efeito destas sobre o fator de transcrição NF- κ B. Para tanto, neste trabalho foram realizados testes com o objetivo de avaliar a concentração deste fator transcricional na fração nuclear de macrófagos estimulados com LPS e expostos a fração terpenoídica e ao β -sitosterol, incubados por períodos de 24, 48 e 72 hs.

Na Figura 10 e Tabela 7 observamos que houve uma moderada diminuição da concentração deste fator nas frações nucleares dos macrófagos expostos às amostras testadas quando comparadas ao controle positivo LPS. Esta inibição ocorreu de maneira dose-dependente e de maneira geral se mostrou mais efetiva quando realizada pela fração terpenoídica. No período de 24 hs a inibição da concentração de NF- κ B variou de 12,34% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 29,42% (2mg/mL, fração terpenoídica) se comparadas aos resultados apresentados pelos macrófagos estimulados com LPS. De modo semelhante, a incubação de 48 hs apresentou valores variando de 9,07% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 32,44%

(2mg/mL, fração terpenoídica), obtendo desta maneira os melhores resultados para a inibição de NF- κ B. Por outro lado, o período de 72 hs apresentou resultados menos significativos com inibições das concentrações deste fator variando de 8,84% (0,5mg/mL, β -sitosterol) a 24,01% (2mg/mL, fração terpenoídica), quando comparadas à concentração de NF- κ B presente na fração nuclear de macrófagos estimulados somente com LPS. Estes resultados são condizentes aos outros observados pelos mediadores estudados neste trabalho, considerando que os mesmos também apresentaram melhores resultados nos períodos de 24 e 48 hs (preferencialmente em 48 hs) e na presença da fração terpenoídica, na maior parte dos ensaios.

Nos ensaios imunológicos realizados pudemos observar que de maneira geral, a fração terpenoídica apresentou melhores resultados se comparada a substância β -sitosterol. Isto provavelmente ocorre em conseqüência do sinergismo de moléculas presentes na fração terpenoídica. Este sinergismo pode ser considerado uma vantagem dos fitoterápicos, justificando atualmente seu uso. De maneira geral, as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares. Pode ser mencionado, por exemplo, o efeito antimalárico da artemisina, composto presente na *Artemísia annua*, atualmente utilizada no combate ao *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*. Aparentemente, vários flavonóides desta planta apresentam algum efeito sinérgico sobre a malária quando associados a artemisinina. Além disso, pode ocorrer associação de mecanismos de ação por atuação dos compostos em alvos moleculares diferentes. (GOEPEL et al., 1999; YUNES et al., 2001).

Somente após a análise de TODOS estes resultados é que pudemos compreender os dados iniciais de viabilidade celular (Figura 3). Relembrando estes surpreendentes resultados, nos quais as menores concentrações apresentaram maior citotoxicidade é possível agora concluir que este fato ocorreu provavelmente pela expressiva atividade antiinflamatória induzida pelas concentrações mais elevadas, inibindo a produção de substâncias citotóxicas como NO e ROIS (FEDERICO et al., 2007). Concluimos portanto que a inibição praticamente total da produção dos mediadores pró-inflamatórios, pelas maiores concentrações das amostras testadas, “poupou” a morte dos macrófagos peritoneais murinos desencadeada por estas moléculas citotóxicas.

Em relação a produção de citocinas é possível correlacionar nossos estudos com trabalhos realizados em outros laboratórios. *Phyllanthus urinaria* apresentou efeito antiinflamatório com a inibição da produção de NO, TNF- α e IL-1 em macrófagos peritoneais murinos ativados com LPS e IFN- γ (FANG et al., 2008). De modo semelhante Curcuma

apresentou atividade imunomoduladora através da inibição da ativação de NF- κ B e inibição da produção de TNF- α e IL-12 por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS (GAO et al., 2004). Em outro estudo o extrato etanólico do pólen de pinho apresentou efeito antiinflamatório com inibição dos mediadores inflamatórios NO, TNF- α , IL-1 e IL-6 em macrófagos RAW 264.7 ativados com LPS (LEE et al., 2009).

Paralelamente ao estudo do efeito antiinflamatório da fração terpenoídica e da substância β -sitosterol, isolados a partir do extrato clorofórmico de *Q. multiflora*, foram realizados ensaios para a determinação da atividade citotóxica destas amostras sobre células das linhagens tumorais murinas pulmonar (LP07) e de adenocarcinoma de mama (LM3), durante incubação de 24 hs. Na Tabela 8 podemos observar que tanto a fração terpenoídica quanto o β -sitosterol apresentaram valores de IC₅₀ superiores aos da droga padrão Taxol[®]. Isto significa que menores quantidades de Taxol[®] são suficientes para a morte de 50% das células de linhagens tumorais. No entanto, vale destacar que a análise apenas quantitativa deste valor não é suficiente para comparar a potência da droga padrão com a das substâncias testadas, isto porque a potencialidade de uma droga antitumoral está diretamente relacionada a sua capacidade seletiva de toxicidade (SIZUM et al., 1988). Portanto, apesar de nossas amostras matarem 50% das células tumorais em concentrações mais elevadas do que as utilizadas pelo Taxol[®] (Tabela 8), quando analisamos as concentrações utilizadas nos ensaios imunológicos (2, 1, 0,5 mg/mL das substâncias), observamos que as mesmas apresentaram efeito extremamente tóxico às células tumorais, porém não aos macrófagos (Tabela 8), indicando surpreendente seletividade citotóxica.

Os anos dedicados ao estudo de *Q. multiflora* foram úteis na investigação dos efeitos desta planta sobre o sistema imunológico e células de linhagens tumorais considerando-se que a planta estudada é utilizada empiricamente por parte da população do cerrado no tratamento de doenças inflamatórias sem nenhum cuidado ou preocupação com dosagem tóxicas e terapêuticas. Além disto, foi possível determinar quais substâncias presentes em *Qualea multiflora* são responsáveis por suas atividades farmacológicas e com isto poderemos direcionar estudos mais aprofundados com objetivo de tornar viável o uso desta planta no tratamento de doenças.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a fração terpenoídica e β -sitosterol possuem potente atividade antiinflamatória inibindo a produção do mediador NO e citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-12 e estimulando a produção da citocina antiinflamatória IL-10, de maneira dose-dependente pelos macrófagos peritoneais murinos. Do mesmo modo, houve uma significativa inibição do fator de transcrição NF- κ B, responsável pela transcrição de genes de mediadores e citocinas pró-inflamatórias associados a processos patológicos inflamatórios. Este fato pode sugerir o possível mecanismo de ação antiinflamatória das amostras testadas. Além disso, verificamos de maneira geral, que a fração terpenoídica possui uma melhor atividade antiinflamatória se comparada a substância isolada β -sitosterol, provavelmente pela ação sinérgica de várias moléculas presentes nesta fração. Analisando os períodos de incubação concluímos que o melhor período de incubação é 48 hs, seguido de 24 hs.

A determinação da atividade antitumoral da fração terpenoídica e β -sitosterol utilizando as linhagens LM3 e LP07 mostrou extrema atividade citotóxica das amostras sobre estas células, porém não sobre os macrófagos.

Considerando que a inibição de mediadores inflamatórios é importante para a contenção tumoral e que as amostras em questão apresentaram surpreendente atividade citotóxica seletiva sobre as linhagens tumorais estudadas, podemos sugerir que a planta *Qualea multiflora* possui grande potencial terapêutico.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p.23; 236; 240; 276; 282; 301-302.
- ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v.2, p. 283-318, 1984.
- ADERKA, D.; LE, J.; VILCEK, J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and mice. **J. Immunol.** v. 143, p.3517-3523, 1989.
- AKIRA, S.; HIRANO, R.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL1 and TNF). **Faseb J.**, v.4, n.11, p.2860-2867, 1990.
- ALLAVENA, P.; SICA, A.; SOLINAS, G.; PORTA, C.; MANTOVANI, A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 66, p.1-9, 2008.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis, Brasília.: EMBRAPA, 1998.
- ARNOTT, C.H.; SCOTT, K.A.; MOORE, R.J.; ROBINSON, S.C.; THOMPSON, R.G.; BALKWILL, F.R. Expression of both TNF- α receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development, **Oncogene**. v.23, p.1902-1910, 2004.
- BABBAR, N. R.A.; CASERO J. Tumor necrosis factor- α increases reactive oxygen species by inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for inflammation-induced carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.66, p.11125-11130, 2006.
- BARNES, P.J. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. **Cytokine and Growth Factor Rev.**, v.14, p.511– 522, 2003.
- BENSINGER, S.J.; TONTONOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**. v.454, p. 470-477, 2008.
- BEUTLER, B.; CERAMI, A.; Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. **Annu. Rev. Biochem.**, v.57, p.505- 518, 1988.
- BIRD, S.; ZOU, J.; WANG, T.; MUNDAY, B.; CUNNINGHAM, C.; SECOMBES, J. Evolution of interleukin-1 beta. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, p. 483-502, 2002.
- BIOQUE, G.; CRUSIUS, J.B.; KOUTROUBAKIS, I.; BOUMA, G.; KOUSTENSE, P.J.; MEUWISSEN, S.G., PENA, A.S. Allelic polymorphism in IL-1 and IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) genes in inflammatory bowel disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v.102, p.379-383, 1995.
- BOGDAN, C; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J. Exp. Med.**, v.174, p.1549, 1991.

BOGDAN, C. The multiplex Function of Nitric Oxide in (Auto) immunity **J.Exp.Med.**, v.187, n.9, p.1361-1365, 1998.

BRASIL Primeiro relatório nacional para a conservação sobre diversidade biológica: Brasil. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Brasília, 1998.

BRITO, A. R. M. e BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **J. Etnopharmacol.**, v. 39, p.53-67, 1993.

CARLI, C.B.A.; MATOS, D.C.; LOPES, F.C.M.; MAIA, D.C.G.; DIAS, M.B.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; ANDREO, M.A.; VILEGAS, W.; COLOMBO L.L.; CARLOS I. Z. Isolated Flavonoids against Mammary Tumour Cells LM2. **Z. Naturforsch.**, (*in press*).

CARLOS, I.Z.; MONNAZZI, L.G.S.; FALCÃO, D.P.; DE MEDEIROS, B.M.M. TNF , H₂O₂ and NO response of peritoneal macrophages to Yersinia terocolitica O:3 derivatives. **Microb. Infect.**, v. 6, p.207-212, 2004.

CASALE, T.B.; COSTA, J.J.; GALLI, S.J. TNF- α is important in human lung allergic reaction. **Am. J. Respr. Cell Mol. Biol.**, v.15, p.35-44, 1996.

CASSADY, J.M., DOUROS, J.D. **Anticancer agents based on natural product models**. New York, Academic Press: 1980.

CHEN, T.; STONER, G.D. Inducible nitric oxide synthase expression in N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced rat esophageal tumorigenesis. **Mol. Carcinog.**, v.40, p.232-240, 2004.

CHOI, S.K; PARK Y.S.; CHOI D.K.; CHANG H.I. Effects of Astaxanthin on the Production of NO and the Expression of COX-2 and iNOS in LPS-Stimulated BV2 Microglial Cells. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.18, p.1990-1996, 2008.

CLEMONS, K. V.; DARBONNE, W. C.; CURNUTTE, J. T.; SOBEL, R. A.; STEVENS, D.A. Experimental histoplasmosis in mice treated with anti-murine interferon-gamma antibody and in interferon-gamma gene knockout mice. **Microbes Infect.**,v.2, n.9, p.997-1001,2000.

CÔRREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974, v.5.

COSTA, E.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LIMA, E.O.; SUCUPIRA, G.C.; BERTOLIN, A.O.; LOLIS, S.F.; ANDRADE, F.D.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A.R. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. **Phytoter. Res.** v. 22, p. 705-707, 2008.

DINARELLO, C.A. Biology of interleukin-1. **Faseb J.**, v. 2, p. 108-115, 1988.

- DINARELLO, C.A.; GELFAND, J.A.; WOLFF, S.M. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. **JAMA**. v.269, n.14, p.1829-35, 1993.
- DRAPIER, J.C.; WIEETZERBIN, J.; HIBBS, J.B. Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 18, p. 1587-1592, 1988.
- 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.**, v.18, p.487-492, 1997.
- ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brasil. **J. Ethnopharmacol.**, v.38, p. 137-143, 1993.
- FALKOFF, R.J.M.; MURAGUCHI, A.; HONG, J-X.; BUTLER, J.L.; DINARELLO, C.A.; FAUCI, A.S. The effects of interleukin 1 in human B cell activation and proliferation. **J.Immunol.**, v.131, p.801-805, 1983.
- FANG, S.; RAO, Y.K.; TZENG, Y. Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 116, p.333-340, 2008.
- FEDERICO, A.; MORGILLO, F.; TUCCILLO, C.; CIARDIELLO, F.; LOGUERCIO, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, v.121, p.2381–2386, 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.
- FICHTNER-FEIGL, S.; FUSS, I.J.; PREISS, J.C.; STROBER, W.; KITANI, A. Treatment of murine Th₁- and Th₂-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappaB decoy oligonucleotides. **J. Clin. Invest.** v.115, p.3057–3071, 2005.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique** 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1994, 486p.
- GAO, X.; KUO, J.; JIANG, H.; DEEB, D.; LIU, Y.; DIVINE, G.; CHAPMAN, R.A.; DULCHAVSKY, S.A.; GAUTAM, S.C. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro. **Biochem. Pharmacol.**, v.68, p.51-61, 2004.
- GASPI, F.O.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; MORENO, R.A. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. **J. Ethnopharmacol.**, v.107, p.19-24, 2006.
- GAZZINELLI, K.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. **J.Immunol.**, v.148, p.1792, 1992.

GELIN, J.; MOLDAWER, L.L.; LONNROTH, C.; SHERRY, B.; CHIZZONITE, R.; LUNDHOLM, K. Role of endogenous tumour necrosis factor- α and interleukin-1 for experimental tumour growth and the development of cancer cachexia. **Cancer Res.**, 51, 415-421, 1991.

GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. **Annu. Rev. Immunol.** v.16, p.225-260, 1998

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell.** v.109, p. 81-96, 2002.

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

GIDDAY, J.M.; PARK, T.S.; SHAH, A.R.; GONZALES, E.R.; Modulation of basal and post-ischemic leukocyteendothelial adherence by nitric oxide. **Stroke**, v.29, p.1423-1429, 1998.

GIRÓN, N.; TRAVÉS, P. G.; RODRÍGUEZ B.; LÓPEZ-FONTAL, R.; BOSCÁ, L.; HORTELANO, S.; HERAS B. Supression of inflammatory responses by labdane-type diterpenoids **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.228, p.179-189, 2008.

GOEPEL, M.; HECKER, U.; KREGE, S.; RUBBEN, H.; MICHEL, M.C. Saw palmetto extracts potently and noncompetitively inhibit human alpha-adrenoceptors in vitro. **Prostate**, v. 38, n.3, p.208-215, 1999.

GOSWAMI, S.K.; DAS, D.K. Resveratrol and chemoprevention. **Cancer Lett.** 2009 (*in press*)

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B.. The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 66 (Supl. 1 - Parte I): p.205-210, 1994.

GRANDI ,T.S.M.; TRINDADE, J.A.; PINTO, M.J.F.; FERREIRA, L.L.; CATELLA, A.C. Plantas Medicinaias de Minas Gerais, Brasil, **Acta Bot. Bras.** v.3, 1989

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell.** v.100, p.57-70, 2000.

HIBBS, J.B. Jr.; WESTENFELDER, C.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; KABLITZ, C.; BARANOWSKI, J.H.; WARD, R.L.; MENLOVE, R.L.; McMURRY, M.P.; KUSHNER, J.P.; SAMLOWSKI, W. Evidence for cytokine- inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin- 2 therapy. **J.Clin.Invest.**, v.89, p.867-877, 1992.

HIRUMA-LIMA, C.A.; SANTOS, L.C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C.H.; SILVEIRA, G.G.; VASCONCELOS, P.C.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R. Qualea

- grandiflora, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.104, p.207-214, 2006.
- HOFSETH, L.J.; HUSSAIN, P.; WOGAN, G.N.; HARRIS C.C. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. **Free Radical Biol. Med.**, v. 34, p.955-968, 2003.
- HOLMES-McNARY, M.; BALDWIN JR, A. S. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. **Cancer Res.**, Baltimore, v.60, n.13, p.3477-3483, 2000.
- HOLSCHER, C. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. **Med. Microbiol. Immunol.** v. 193, p.1–17, 2004.
- HUANG, A.C.; LIN, S.Y.; SU, C.C.; LIN, S.S.; HO, C.C.; HSIA, T.C.; CHIU, T.H.; YU, C.S.; IP, S.W.; LIN, T.P.; CHUNG, J.G. Effects of curcumin on N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)-induced lung and liver tumorigenesis in BALB/c mice in vivo. **In vivo**, v.22, p.781-795, 2008.
- IONTCHEVA, I.; AMAR, S.; ZAWAWI, K.H.; KANTARCI, A.; VAN DYKE, T.E. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. **Infect Immun.**, v.72, p.2312–2320, 2004..
- JADESKI L.C.; LALA P.K. Nitric oxide synthase inhibition by NG-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumour-induced angiogenesis in mammary tumours. **Am. J. Pathol.**, v.155, p.1381–1390, 1999.
- JAISWAL, M.; LARUSSO, N.F.; BURGART, L.J.; GORES, G.J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. **Cancer Res.** v.60, p. 184–190, 2000.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPOT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology**. 5th. ed., New York, Garland Publishing: 2001.
- KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; GOTTLIEB, O.R. Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 66 (Supl. 1 - parte I): 50-55, 1994.
- KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol.** v.24, p.25–29, 2003.
- KARIN, M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. **Nature**, v.441, p.431-436, 2006.
- KIM, J.; PARK, S. J; YUN, K.; CHO, Y.; PARK, H.; LEE, K. Isoliquiritigenin isolated from the roots of Glycyrrhiza uralensis inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. **Eur. J. Pharmacol.**, v.584, p.175–184, 2008.
- KLEINERT, H.; PAUTZ, A.; LINKER, K.; SCHWARZ; P. M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Eur. J. Pharmacol.**,v. 500, p.255–266, 2004.

KLOTZ, L.; SCHMIDT, M.; GIESE, T.; SASTRE, M.; KNOLLE, P.; KLOCKGETHER, T.; HENEKA, M.T. Proinflammatory stimulation and pioglitazone treatment regulate peroxisome proliferator-activated receptor gamma levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy controls and multiple sclerosis patients. **J. Immunol.**, v.175, p.4948-4955, 2005.

KUNDU, J.K.; SURH, Y. Inflammation: Gearing the journey to cancer. **Mutation Res.**, v. 659, p.15-30, 2008.

LAPPAS, M.; PERMEZEL, M.; GEORGIU, H.M.; RICE, G.E. Nuclear factor kappa B regulation of pro-inflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. **Biol. Reprod.**, v.67, p.668-673, 2002.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.** v.2, p.787-795, 2002.

LEE, K.H.; KIM, A.J.; CHOI, E.M. Antioxidant and antiinflammatory activity of pine pollen extract in vitro. **Phytother. Res.**, v.23, p.41-48, 2009.

LEE, S.; BAI, S.; LEE K.; NAMKOONG S.; NA H.; HA K.; HAN J.; YIM S.; CHANG K.; KWON Y.; LEE S.K.; KIM Y. Astaxanthin Inhibits Nitric Oxide Production and Inflammatory Gene Expression by Suppressing I κ B Kinase-dependent NF- κ B Activation. **Mol. Cells**, v.16, n.1, p.97-105, 2003.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappa B regulation in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v.10, p.725-734, 2002.

LIU, S.F.; MALIK, A.B. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v.290, p.622-645, 2006.

LOWENSTEIN, C.J.; HILL, S.L.; LAFOND-WALKER, A.; WU, J.; ALLEN, G.; LANDAVERE, M.; ROSE, N.R.; HERSKOWITZ, A. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. **J. Clin. Invest.**, v.97, p.1837-1843, 1996.

LUO, J.; TAN, W.; RICONO, J. M.; KORCHYNSKYI, O.; ZHANG, M.; GONIAS, S L.; CHERESH D. A.; KARIN, M. Nuclear cytokine-activated IKK α controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. **Nature**. v. 446, p.690-694, 2007.

LUSTER, M.I.; GERMOLEC, D.R.; YOSHIDA, T.; KAYAMA, F.; THOMPSON, M. Edotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. **Hepatology**, v.19, p.480-488, 1994.

MACKANESS, G.B. Cellular resistance to infection. **J. Exp. Med.**, v. 116, p.381-406, 1962.

MACMICKING, J.D.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.323-350, 1997.

- 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.
- MANNA, S. K.; MUKHOPADHYAY, A.; VAN, N. T.; AGGARWAL, B. B. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kB:c-Jun N-terminal kinase and apoptosis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.163, p. 6800–6809, 1999
- MANTOVANI, A., MARCHESI, F.; PORTA, C.; SICA, A.; ALLAVENA, P. Inflammation and cancer: Breast cancer as a prototype. **Breast**, v.16, p.27-33, 2007.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL F. Cancer-related inflammation. **Nature**. v.454, p.436-444, 2008.
- MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature**. v.457, p.36-37, 2009.
- MARKIEWICZ, M. A.; WISE, E.L.; BUCHWALD, Z.S.; CHENEY, E. E.; HANSEN, T. H.; SUR, A.; CEMERSKI, S.; ALLEN, P. M.; SHAW, A. S. IL-12 Enhances CTL Synapse Formation and Induces Self-Reactivity. **J. Immunol**. v. 182, p. 1351-1361, 2009.
- MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.12231-12234, 1993.
- MARNETT, L. J. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. **Cancer Res.**, v. 52, n. 20, p. 5575-5589, 1992.
- MIZEL, S.B. Interleukin 1 and T cell activation. **Immunol. Rev.**, v.63, p.51-72, 1982.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, n.2, p.109-142, 1991.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NAKAO, S.; KUWANO, T.; TSUTSUMI- MIYAHARA, C.; UEDA, S.; KIMURA, Y.N.; HAMANO, S.; SONODA, K.; SAIJO, Y.; NUKIWA, T.; STRIETER, R.M.; ISHIBASHI, T.; KUWANO, M.; ONO, M. Infiltration of COX2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1-induced neovascularization and tumor growth. **J. Clin. Invest.** v.115, p.2979–2991, 2005.
- NASSER, A.L.M., CARLI, C. B. A.; RODRIGUES, C. M.; MAIA, D. C. G.; CARLOS, I. Z.; EBERLIN, M. N.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS W. Identification of Ellagic Acid Derivatives in Methanolic Extracts from *Qualea* Species. **Z. Naturforsch.**, v.63c, p.794-800, 2008.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages, **J. Clin. Invest.**, v.79, p.319–326, 1987.

NATHAN, C.F. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v.6, p.3051-3064, 1992.

NAUGLER, W. E.; SAKURAI, T.; KIM, S.; MAEDA, S.; KIM, K.; ELSHARKAWY, A.M.; KARIN, M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. **Science**, v.317, p.121–124, 2007.

NAUNDORF, S.; SCHRODER, M.; HOFlich, C.; SUMAN, N.; VOLK, H.D.; GRUTZ, G. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. **Eur. J. Immunol.**, 2009 (*in press*).

O'CONNELL, M.A.; BENETT, B.L., MERCURIO, F.; MAINNING, A.M.; MARKMAN, N. Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells. **J. Biol. Chem.**, v.46, p.30410–30414, 1996.

OPPENHEIM, J. J.; RUSCETTI, F. W.; FALTYNEK, C. R. Cytokines. In: STITES, D. P.; STOBO, J. D.; WELLS, J. V. **Basic clin. immunol.**, 8th. ed. Connecticut: Appleton e Lange, 1994. cap.9, p.105-123.

OSWALD, I.P.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A.; JAMES, S.L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. **J. Immunol.**, v.148, p. 3578-3586, 1992.

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

PALMER, R.M.J; ASHTON, D.S.; MONCADA S.. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Combinatorial Inhibitory Effects on LPS-Induced Responses. **Nature**, v.333, p.664-666, 1988.

PLOTKIN, M. J.. Traditional knowledge of medicinal plants: the search for new jungle medicines.. In: O. Akerele, V. Heywood e H. Synge. **Conservation of medicinal plants**. p.53-64, 1991

PONCHEL, F.; MORGAN, A.W.; BINGHAM, S.J.; QUINN, M.; BUCH, M.; VERBURG, R.J.; HENWOOD, J.; DOUGLAS, S.H.; MASUREL, A.; CONAGHAN, P.; GESINDE, M.; TAYLOR, J.; MARKHAM, A.F.; EMERY, P.; VAN LAAR, J.M.; ISAACS, J.D. Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis. **Blood**, v.100, p.4550–4556, 2002.

POTT,A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal. Planaltina**, Embrapa., p.41, 1994.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Ann. Bot.**, v.80, p.223-230, 1997.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: S. M. Sano e S. P. Almeida (eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, Embrapa Cerrados: 1998, p.87-166.

RIGBY, R.J.; SIMMONS, J.G.; GREENHALGH, C.J.; ALEXANDER, W.S.; LUND, P.K. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) limits damage-induced crypt hyperproliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon. **Oncogene**, v.26, p.4833–4841, 2007.

SAKAGAMI, T.; VELLA, J.; DIXON, M.F.; ROURKE, J.; RADCLIFF, F.; SUTTON, P.; SHIMOYAMA, T.; BEAGLEY, K.; LEE, A. The endotoxin of *Helicobacter pylori* is a modulator of host-dependent gastritis. **Infect. Immun.**, v.65, p.3310-3316, 1997.

SANCHEZ-PEREZ, I.; BENITAH, S.A.; MARTINEZ-GOMARIZ, M.; LACAL, J.C.; PERONA, R. Cell stress and MEKK1-mediated c-Jun activation modulate NFkappa B activity and cell viability. **Mol. Biol. Cell.**, v.13, p.2933–2945, 2002.

SANTO, B. R. E. **Os caminhos da agricultura brasileira**. São Paulo: Evoluir, 2001.

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

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman, A: The pharmacological basis of therapeutics**, 10th ed. New York, McGraw-Hill: 2001, p.1649–1677.

SENCINA, D.S.; DUSTIN, A. M; ASP, J. M.; JOHNSON, J.A.; CUNNICK, J. E.; KAISER, M.;S. KOHUT, M.L. Changes in immunomodulatory properties of *Echinacea* spp. root infusions and tinctures stored at 4 °C for four days. **Clin. Chim. Acta**, v.355, p.67-82, 2005.

SEPTÍMO, L.R. **Fitoterapia baseada em ervas medicinais do cerrado**. Brasília, DF: SIPE. Ministério da Agricultura, 1994.

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**, v. 83, n. 1, p.112-120, 2000.

SIZUM, P.; AUCLAIR, C.; LESCOT, E.; PAOLETTI, C.; PERLY, B.; FERMANDJIAN, S. Stacking and edge-to-edge associations of antitumoral ellipticine derivatives are controlled in solution by interactions involving their nitrogen sites. **Biopolymers**, v.27, p.1085-1096, 1988.

SPITS, H; DE WAAL MALEFYT, R. Functional characterization of interleukin-10. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.99, p.8–15, 1992

STOCLET, J.C.; MULLER, B.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; KLESCHYOR, A. Overexpression of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. **Biochemistry**, v.63, p.826-832, 1998.

STRIZ, I.; MIO, T.; ADACHI, Y.; ROMBERGER, D.J.; RENNARD, S.I. Th2-type cytokines modulate IL-6 release by human bronchial epithelial cells. **Immunol. Lett.**, v.70, n.2, p.83-88, 1999.

SULLIVAN, L.A.; LIONGUE, C.; LEWIS, R. S.; STEPHENSON, S.E.M.; WARD, A.C. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. **Mol. Immunol.**, v.44, p.2497-2506, 2007

SURH, Y.J.; CHUN, K.S.; CHA, H.H.; HAN, S.S.; KEUM, Y.S.; PARK, K.K.; LEE, S.S. Molecular mechanism underlying chemopreventive activities of antiinflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. **Mutat. Res.** v.48, p.243-268, 2007.

SWEET, M. J.; HUME, D. A. Endotoxin signal transduction in macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, 60, 8-26 (1996).

THIEMERMANN, C.; VANE, J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, v.182, p.591-595, 1990.

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**, v. 84, n. 12, p. 4008-4027, 1994.

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

TORISU, H.; ONO, M.; KIRYU, H.; FURUE, M.; OHMOTO, Y.; NAKAYAMA, J., NISHIOKA, Y.; SONE, S.; UWANO, M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF alpha and IL-1 alpha, **Int. J. Cancer**, v. 85, p.182-188, 2000.

TSAI, S.H.; LIN-SHIAU, S.Y.; LIN, J.K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. **Br. J. Pharmacol.**, v.126, n.3, p.673-680, 1999.

VERNOOY, J.H.; DENTENER, M.A.; VAN SUYLEN, R.J.; BUURMAN, W.A.; WOUTERS, E.F. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology. **Cell. Mol. Biol.**, v.26, p.152-159, 2002.

WARGOVICH, M. J., WOODS, C.; HOLLIS, D. M.; ZANDER, M. E. Herbals, cancer prevention and health. **J. Nutr.**, v. 131, n. 11, p. 3034-3036, 2001.

WATARI, K.; NAKAO, S.; FOTOVATI, A.; BASAKI, Y.; HOSOI, F.; BERECZKY, B., HIGUCHI, R.; MIYAMOTO, T.; KUWANO, M.; ONO, M. Role of macrophages in inflammatory lymphangiogenesis: Enhanced production of vascular endothelial growth factor C and D through NF-kB activation.

WEISBURGER, J. H.; RIVENSON, A.; ALIAGA, C.; REINHARDT, J.; KELLOFF, G. J.; BOONE, C. W.; STEELE, V. E.; BALENTINE, D. A.; PITTMAN, B.; ZANG, E. Effect

of tea extracts, polyphenols, and epigallocatechin gallate on azoxymethane-induced colon cancer. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.217, p.104–108, 1998.

World Health Organization. **Regulatory situation of herbal medicines:** a worldwide review. Geneva: WHO, 1998, p.45.

XIE, K. FIDLER, I.J. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. **Cancer Metastasis Rev.** v.17, p.55–75, 1998.

YAN, L.; ANDERSON, G.M.; DEWITTE M M.; NAKADA M.T. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. **Eur. J. Cancer**, v.42, p.793-802, 2006.

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

**ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-TUMORAL PROPERTIES OF *QUALEA*
*MULTIFLORA***

Camila B. de A. Carli^a, Marcela Bassi^a, Lucas Colombo^c, Ana Lucia Martiniano Nasser, Wagner
Vilegas^b and Iracilda Z. Carlos^a. *

^aUNESP - São Paulo State University, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, C. Postal 502,
14801-902, Araraquara, SP, Brazil. Fax: 551633016559. E-mail: carlosiz@fctar.unesp.br

^bUNESP - São Paulo State University, Instituto de Química de Araraquara, C. Postal 355,
14801-970, Araraquara, SP, Brazil.

^c Buenos Aires University, Instituto de Oncologia, UBA, Argentina

Funding. This work was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) (02/05503-6).

ABSTRACT

In this work, it was evaluated the anti-inflammatory and anti-tumoral activities of fractions obtained from the plant *Qualea multiflora*. The fractions of the plant utilized in these experiments were Fraction A, rich in terpenoids and Fraction β , rich of β -sitosterol. "In vitro" experiments were performed in order to analyze the activities of those components upon the immune system by means of assays to determine the inhibition of the production of nitric oxide (NO), the determination of the inhibition of transcription factor NF- κ B and of the cytokines IL-1, IL-6, IL-12 and TNF- α as well as the determination of the production of IL-10. Furthermore, tests were also performed so as to evaluate the anti-tumoral activities of the tested samples against LM3 and LP07 cells, respectively, mammary and pulmonary tumoral cell lineages.

The results of the experiments showed intense inhibition of the production of NO, by the peritoneal macrophages exposed to Fraction A and Fraction β . We also verified that IL-1, IL-12 and TNF- α were strongly inhibited by the tested substances. Similarly, there was a significant inhibition of transcription factor NF- κ B. On the other hand, there was a large stimulation of the production of IL-10 anti-inflammatory cytokine. Additionally, the samples tested showed exceptional selective cytotoxic effect upon tumoral cell lineages. Those promising results suggest the possible use of *Qualea multiflora* on the control of inflammations as well as its possible use against some types of tumours.

Key Words: Macrophages, Interleukins, Nitric oxide, Antitumour activity and *Qualea multiflora*.

INTRODUCTION

The *Qualea* genus occurs throughout the whole tropical America, from Mexico, passing through Peru and Guyanas, reaching as far south as Brazil, where it has a marked presence in the Brazilian cerrado¹. Researchers have demonstrated the occurrence of tannines in *Qualea parviflora*, with the use of its powdered bark, or tea, as an external antiseptic, while the leaves are used for treatment of heartburns². The bark and leaves of *Qualea grandiflora* are used as an adstringent and against diarrheas; for the cleansing of external ulcers and also against inflammations^{3,4}.

In some tumour types over 70% of the mass of the tumour consists of infiltrating leukocytes. These tumour-associated leukocytes, specially macrophages, release angiogenic factors, mitogens, proteolytic enzymes and chemotactic factors, recruiting more inflammatory cells and sustaining tumour growth, invasion and angiogenesis⁵. Macrophages constitute one of the main groups of phagocytes in the immunological system and part of their effectiveness is due to their production of nitric oxide (NO) and cytokines⁶. Research in the last few years has revealed, however, the involvement of NO in carcinogenesis, through the stimulation of processes such as initiation, promotion, progression, metastasis and angiogenesis⁷. The production NO is regulated by cytokines such as tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ)⁸. Additionally, the cytokines IL-1, IL-6, IL-12 and IL-10 are responsible for the modulation of the macrophages by means of either activating or inhibiting those cells. Among those cytokines, IL-10 is the only one which has inhibiting activities on macrophages, presenting anti-inflammatory properties.

In the present work, it was initially performed a screening with the crude chloroform extract of *Qualea multiflora* in order to evaluate the therapeutic potential of the plant. After the initial steps, experiments were performed to assess the antiproliferative and anti-inflammatory activity of Fraction A and Fraction β , isolated from the chloroformic extract of *Qualea multiflora*. The aim of this study is to contribute to the discovery of potential phytopharmacs which, besides fulfilling an antiproliferative role, can also act as anti-inflammatory agents in the contention of tumours.

MATERIALS AND METHODS.

Plant material

The extracts of the plants were prepared at the Instituto de Química, UNESP at Araraquara, under the guidance of Prof. Dr. Wagner Vilegas. Leaves of the specie were used to produce the extract, which was made with organic solvents as specified below. The plant sample was kiln-dried at 40 °C, powdered in a lyophilisator and its extract was exhaustively obtained through the use of chloroform. The distillation of the extract was performed by the use of a rotatory evaporator with the obtention of the crude extract. The chloroformic extract was fractioned in a column of silica gel through the use of a polarity crescent gradient (hexane→clorophorm→methanol), which produced the terpenoidic fraction (Fraction A) and the fraction rich of β -sitosterol (Fraction β).

Animals

Swiss mice (6 - 8 weeks old, weighing 18 - 25 g) were maintained in a polycarbonate box at (23 \pm 1) °C, (55 \pm 5) % humidity, 10 - 18 circulations/h and a 12-h light/dark cycle, with free access to water and chow (Purina). All animals were maintained and handled according to International Ethical Guidelines for the Care of Laboratory Animals (Faculty Ethics Committee # n 29/2006).

Peritoneal exudate cells

Thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells (PEC) were harvested from Swiss mice in 5.0 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The cells were washed three times by centrifugation at 200 x g for 5 min at 4 °C with 3.0 mL PBS. The cells were then resuspended in 1.0 mL RPMI-1640 culture medium (Sigma) containing 2 . 10⁻⁵ M b-mercaptoethanol (Sigma), 100 U/mL penicillin (Sigma), 100 U/mL streptomycin (Sigma), 2 mM L-glutamine (Sigma), and 5% fetal bovine serum (Sigma). The medium of this composition was denoted complete RPMI-1640 (RPMI-1640-C) and was used for cell counts in a Neubauer chamber (Boeco, Germany). For the proposed tests, the cell suspension was adjusted to the specific concentration required for each test.

LM3 and LP07 Cell lineages

The mamary adenocarcinomal (LM3) and lung (LP07) murine lineages were kindly supplied by the Angel H.Roffo Oncology Institute - Buenos Aires - Argentina.

The LP07 lineage was derived from the P07 tumour maintained by several subcutaneous passages. From the "in vivo" lineage, it was obtained the "in vitro" lineage which was called "LP07". On the other hand, the LM2 lineage is originated from a mammary adenocarcinoma obtained in Balb/c mice, with lung metastases.

Assessment of cellular viability

The cell viability assay was assayed by a method based on the capacity of viable cells to cleave the tetrazolium ring present in MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], owing to the action of dehydrogenase enzymes in the active mitochondria, forming purple formazan crystals (Mosmann, 1983). The cells were resuspended in RPMI-1640 containing 5% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 100 IU/mL streptomycin and 50 mM b-mercaptoethanol, and adjusted to $5 \cdot 10^6$ cells/mL. 100 μ L of the suspension and 100 μ L of Fraction A and Fraction β , and Taxol[®] were added to each well of a microplate, where the peritoneal macrophages were incubated for 48 h. MTT solution was added (100 μ L) and the plate was incubated for 3 h at 37 °C with 5% CO₂. Absorbance was read in a UV/Vis spectrophotometer at a wavelength of 540 nm, with a reference filter of 620 nm. The culture medium and cells alone were used as control, representing 100% viability of the macrophages. For the proposed tests, the crude extract, Fraction A and Fraction β were tested at concentrations resulting in more than 50% cell viability (data not showed)⁹.

Inhibition of NO production

Adherent PEC were resuspended in RPMI-1640-C and adjusted to $5 \cdot 10^6$ cells/mL of the suspension were placed in each well of a 96-well microplate and mixed with 100 μ L of the crude extract, Fraction A and Fraction β . The mixture was completed with 100 μ L LPS (lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4) and the plates were then incubated for 48 h at 37 °C under, 7.5% CO₂. LPS was used as positive control. The nitrite concentrations were indirectly measured by a quantitative colorimetric assay using the Griess reagent system: 50 μ L aliquots of supernatant were added to 50 μ L of Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine and 3% H₃PO₄), incubated at room temperature for 10 min, and the absorbance was measured at 540 nm in an ELISA microplate reader (Multiskan Ascent LabSystems). Samples in triplicate were assayed in four experiments and reported as μ mol NO / $5 \cdot 10^5$ cells, measured from the standard curve¹⁰.

Determination of TNF- α , IL-1, IL-12 and IL-10

For the determination of cytokines TNF- α , IL-1, IL-12 and IL-10, adherent PEC were stimulated with the tested samples, together with LPS (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), except for the determination of IL-10 which was not incubated with the LPS stimulator. After 48 h, the supernatants were removed, filter-sterilized, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until assayed by the immunoenzymatic assay (BD Pharmingen) according to the manufacturer's protocol. Results were expressed in pg/mL .

Determination of transcription factor NF- κB

The quantification of transcription factor NF- κB (sub-unit p65) present in the nuclear fraction of macrophages which were stimulated with LPS and exposed to Fraction A and to Fraction β for 48 hs was evaluated by means of the use of the NF- κB ActivELISA (Ingenex[®]) kit. For this purpose, it was necessary to obtain nuclear fractions from the murine peritoneal cells exsudate. The peritoneal exsudate cells were aseptically obtained as previously described and the cellular concentration was adjusted to $2 \cdot 10^6$ cells/mL in RPMI-1640-C. The obtention of the nuclear fraction was done through the use of the Lysate Preparation Module, contained in the NF- κB ActivELISA (Ingenex[®]) kit. The buffers and solutions contained in the kit were used according to the specifications of the manufacturer.

Antiproliferative activity

Cellular growth was quantified by the MTT assay. Cells were detached with trypsin, washed and transferred into 96-well microtiter plates at a concentration of $3 \cdot 10^4$ cell/mL. 190 μL of the tumour cell suspension were plated in the wells and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ under 5% CO_2 . The microtiter plates containing cells were pre-incubated for 24 h to allow stabilization prior to the addition of the samples. After this period, 100 μL of Fraction A and Fraction β were added and incubated for 48 h under the same conditions. Taxol[®] was used as positive control. After culture, the medium was replaced with fresh medium containing 1 mg/mL of MTT. After 3 h, the medium was removed and 100 μL of isopropanol (Mallinckrodt) were added to solubilize the formazan crystals formed. The absorbance was measured at 540 nm with a reference filter of 620 nm in a spectrophotometer (Multiskan Ascent, Labsystems). The 50% inhibitory concentration for cell growth (IC_{50}) was defined as the dose resulting in 50% reduction of tumour cell proliferation and was calculated with Microcal Origin¹⁰.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), and the Tukey test (Graphpad InStat 3.05) was used to determine the significance of the differences between the positive control and experimental groups.

RESULTS

*Screening of anti-inflammatory activity of crude chloroformic extract of *Qualea multiflora*.*

Table 1 reflects the anti-inflammatory effects of the crude extract through the inhibition percentage of the production of the inflammatory mediators NO, IL-1 and IL-12 by the macrophages which were stimulated with LPS for 48 hs. It was verified that there is no dose-dependent effect, except in the case of the assay for the determination of NO.

Determination of the inhibition of the production of nitric oxide (NO)

In Figure 1, we can observe that there was an intense inhibition of the production of NO by the murine peritoneal macrophages as regards all the concentrations of Fraction A and of Fraction β in a dose dependent manner, with inhibitions close to 100%. Fraction A presented a greater inhibition activity when compared to Fraction β .

Determination of the inhibition of the production of cytokine TNF- α

In Figure 2, we can observe that there was a significant inhibition of the production of TNF- α by the murine peritoneal macrophages in every concentration of the tested samples. These inhibitions occurred in a dose-dependent manner, presenting a close to 100% inhibition when tested with a concentration of 2mg/mL of Fraction A. Overall, Fraction A presented a greater inhibitory activity of TNF- α when compared to Fraction β .

Determination of the inhibition of the production of cytokine IL-1

In Figure 3, we observed a significant inhibition of the production of IL-1 by the murine peritoneal macrophages in all concentrations of the tested samples, in a dose-dependent manner. However, the greatest inhibition of production of IL-1 was observed for the concentration level

of 2mg/mL of Fraction A, in which case a 51,20% inhibition was verified when compared to the positive control. Once again, we can observe that Fraction A possesses a greater inhibitory activity when compared to the Fraction β .

Determination of the inhibition of the production of cytokine IL-12

The results referring to the inhibition of the production of cytokine IL-12 demonstrate that all tested samples presented an expressive inhibition of that cytokine (Figure 4). There was a practically 100% inhibition of the production of IL-12 as regards all tested samples.

Determination of the production of cytokine IL-10

In Figure 5, it is possible to observe an intense production of cytokine IL-10, in a dose-dependent manner. Fraction A presented a better stimulating activity for the production of this cytokine with values near the positive control, when compared to Fraction β .

Determination of the transcription factor NF- κ B

The results referring to the quantification of NF- κ B showed a moderate reduction in the concentration of this nuclear transcription factor, specially as regards the 2mg/mL concentration of Fraction A (Figure 6). The results reflected that the higher the concentration of the tested samples the lower is the concentration of NF- κ B present in the nuclear fraction of peritoneal macrophages. The most significant result is accounted for by Fraction A with a 2mg/mL concentration, which presented a 32.44% inhibition of production of NF- κ B when compared to the positive control (LPS).

Determination of the citotoxic activity in tumoral lineages

Analyzing the values of IC₅₀ (concentration responsible for the death of 50% of the tumour cells), we observed that Fraction A and the Fraction β presented values above those verified by the standard drug Taxol[®] in both tumoral lineages (Table 2). However, if we compare the viability of the peritoneal macrophages with the viability of the tumoral lineages LM3 and LP07 in higher concentrations (2 and 1mg/mL), we can observe that the samples tested do not have a citotoxic effect on the peritoneal macrophages (reflecting a viability of respectively 99.25% and 88.68%) whereas the same concentration levels demonstrated an extremely high citotoxic effect against the tumoral lineage cells, having killed 100% of cells for both tumour lineages at the concentration of 2mg/mL. (Table 3).

DISCUSSION

In the present work, assays were performed with the crude extract, with the Fraction A and with Fraction β in order to assess the pharmacological properties of the plant *Qualea multiflora* Mart belonging to the genus *Qualea*, family Vochysiaceae. In this way we could determine which substances act upon the immunological system and thereby justify the use of this species in popular Brazilian medicine. Based on the data collected amongst the rural population of the Brazilian cerrado, pertaining to the empirical use of that plant it was possible to direct this study to the probable therapeutical effect. Those studies initiated with the screening of the pharmacological activities of the crude extract, which demonstrated inhibitory activities of the production of pro-inflammatory mediators NO, IL-1 and IL-12 (Table 1). Based upon this screening, tests were performed with Fraction A and Fraction β obtained from the chloroform extract of *Qualea multiflora*.

Analyzing the results for the production of NO, we observed that Fraction A and Fraction β exerted immunosuppressive activity on the LPS-stimulated macrophages (Figure 1). This inhibition occurred in a dose-dependent manner with inhibitory results nearing 100%. Fraction A presented a higher inhibitory activity of NO when compared to the Fraction β , but all samples tested presented $p < 0.001$ when compared to LPS. Further reports have confirmed the role of NO in tumour carcinogenesis. NO synthase inhibitors prevent tumour induced angiogenesis in mammary tumours and therapy of cancer methastases can be accomplished by the inactivation of iNOS^{11,12}.

In Figure 2, we can observe that there was a significant inhibition of production of TNF- α by the murine peritoneal macrophages in all concentrations of the tested samples. This inhibition occurred in a dose-dependent manner, with inhibition nearing 100% in the 2mg/mL concentration of Fraction A. We observed that all samples tested presented $p < 0.001$ when compared to LPS. TNF- α acts as a tumour progression factor by modulation of tumour motility or the augmentation of adhesion molecule expression on the target organs¹³.

Regarding the inhibition of production of IL-1 by the LPS stimulated macrophages, we can observe that the production of this cytokine was strongly inhibited in the presence of the tested samples, in a dose dependent manner (Figure 3). Overall, Fraction A presented a better inhibitory activity if compared to Fraction β , except for the 1mg/mL concentration. Results referring to all samples tested reflected statistical difference of $p < 0.001$, when compared to the positive control (LPS), excepting in concentration of 0.5 mg/mL of Fraction β ($p < 0.05$).

Analyzing the results of the inhibition of IL-12, we noted that there was an intense

inhibition of production of that cytokine, presenting inhibitions nearing 100%, for all the samples tested ($p < 0.001$ when compared with LPS) (Figure 4). IL-12 possesses several biological activities, specially through lymphocytes T and NK cells, by means of the production of IFN- γ . Considering that IFN- γ is a potent stimulator of macrophages, IL-12 acts indirectly in the activation of this phagocyte cell. Therefore the determination of this cytokine is essential for the elucidation of the modulation of the innate immune response¹⁴.

In a manner contrary to NO and contrary to all cytokines above mentioned, IL-10 presents anti-inflammatory characteristics, by means of the inhibition of the activation of the macrophages¹⁵. Bearing this in mind, when testing substances for their anti-inflammatory and anti-tumoral properties, it is desirable that those substances tested to present stimulation of the production of this cytokine. Accordingly, in the case of the *Qualea multiflora*, Fraction A and Fraction β presented expressive stimulating activity of the production of this cytokine in non LPS-stimulated macrophages. Results obtained were close to the positive control. This production was dose-dependent and was greater when the macrophages were exposed to Fraction A. On the other hand, the concentration of 0.5mg/mL of Fraction β did not showed stimulatory activity for the production of this cytokine (Figure 5).

In the case of anti-inflammatory drugs, it is very important to determine the effect of those substances on the transcription factor NF- κ B for the elucidation of their action mechanisms. Having this in mind, in this work, assays were performed in order to evaluate the concentration of this transcriptional factor in the nuclear fraction of the macrophages stimulated with LPS and simultaneously exposed to Fraction A and Fraction β . In Figure 6, we observe that there was a moderate inhibition of the concentration of this factor in the nuclear fractions of the macrophages exposed to samples tested. This inhibition occurred in a dose-dependent manner and, generally, was most effective in the case of Fraction A. These results are consistent with the results obtained regarding the other mediators throughout this work, considering that those other mediators presented better results also when the macrophages were exposed to Fraction A. The nuclear factor NF- κ B, in cooperation with other transcription factors, coordinate the expression of the genes that codify iNOS and cytokines in macrophages. A large number of natural substances seem to interfere with the cascade that leads to the activation of NF- κ B. The effect of many extracts obtained from natural sources might now be explained by the fact that those plants contain agents which regulate NF- κ B, like diterpenoids and sesquiterpenic lactones

Through the immunological assays, we could observe that, in a general way, Fraction A presented better results when compared to the crude extract and to Fraction β . This probably occurred due to the better biological effectiveness of molecules present in Fraction A. In spite of the fact that the crude extract contains an even larger number of molecules, the effectiveness observed in Fraction A and Fraction β , might be impaired by the excess of the other unknown molecules, thus blocking the anti-inflammatory activity of the molecules responsible for the properties of Fraction A and Fraction β . The synergism of more purified fractions might be considered an advantage of the phytomedicines. Furthermore, it may occur the association of the action mechanisms by means of the action of compounds on different molecular targets^{17,18}.

The samples were also tested for their antiproliferative activities on the LM3 and LP07 line of tumour cells. All samples tested showed a larger value for IC_{50} than the standard drug Taxol[®]. In spite of the fact that Fraction A and Fraction β require a higher concentration than Taxol[®] in order to obtain the same IC_{50} , the mere quantitative analysis is not enough to compare the potency of Taxol[®] with the tested samples, considering the fact that the potency of an anti-tumoural drug is directly related to its selective toxicity capacity¹⁹. Emphasis should be placed on the fact that Fraction A and Fraction β , both presented an exceptional selective toxicity. At the concentration of 2mg/mL of Fraction A, the viability of the macrophages was near 100%, while the viability of the tumoral cells (LM3 and LP07) were both 0%. As for Fraction β , it was partially toxic to the macrophages at the same concentration (2mg/mL), at 73.34% of viability. As for the viability of the tumoral cells it was also 0%.

Considering that the inhibition of inflammatory mediators is important for tumoural contention, and also that the samples herein studied presented exceptional selective tumoral cytotoxicity, we can suggest that *Qualea multiflora* possesses a promising therapeutic potential. The results obtained highlight the importance of conducting an in-depth study of the species of the Brazilian biome, and show the great potential of its biodiversity in the treatment of chronic inflammatory diseases such as cancer.

Funding and Acknowledgements

The authors are grateful to M.C.P. Placeres for technical support. This work was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

REFERENCES

1. Côrrea M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. Ministério da Agricultura. 1974, 5.
2. Pott A., Pott V.J. Plantas do Pantanal. Planaltina, Embrapa. 1994, p.41.
3. Septímo L.R. Fitoterapia baseada em ervas medicinais do cerrado. SIPE. Ministério da Agricultura. Brasília, 1994.
4. Almeida S.P., Proença C.E.B., Sano S.M., Ribeiro J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis, D.F.: EMBRAPA- Planaltina, 1998.
5. Yan L., Anderson G.M., Dewitte M., And Nakada M.T. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. Eur. J. Câncer. 2006; 42:793-802,.
6. Keil D.E., Luebke R.W., and Pruett B.S. Differences in the effects of dexamethasone on macrophage nitrite production: dependence on exposure regimem (*in vivo* or *in vitro*) and activation stimuli. Int. J. Immunopharmacol. 1999; 17:157-166.
7. Hofseth, L.J.; Hussain, P.; Wogan, G.N.; Harris C.C. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. Free Radical Biol. Med. 2003; 34:955-968.
8. Kovalovsky D., Refojo D., Holsboer F., and Arzt E. Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. J. Neuroimmunol. 2000; 109: 23-9.
9. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 1983; 65:55-63.
10. Green L.G., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 1982; 126:131-138.
12. Xie K. and Fidler I.J. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. Cancer Metastasis Rev. 1998; 17:55-75.

13. Gelin J., Moldawer L.L., Lonroth C., Sherry B., Chizzonite R., Lundholm K. Role of endogenous tumour necrosis factor- α and interleukin-1 for experimental tumour growth and the development of cancer cachexia. *Cancer Res.* 1991; 51:415-421,.
14. Trinchieri G., Scott P. Interleukin-12: basic principles and clinical applications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999; 238:57-78.
15. Spits H, de Waal Malefyt R. Functional characterization of interleukin-10. *Int Arch Allergy Immunol.* 1992; 99:8–15.
16. Palladino M. A., Bahjat F. R., Theodorakis E. A., Moldawer L. L. Anti TNF- α therapies: the next generation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2: 736-746.
17. Goepel M., Hecker U., Krege S., Rubben H., Michel M.C. Saw palmetto extracts potently and noncompetitively inhibit human alpha-adrenoceptors in vitro. *Prostate.* 1999; 38:208-215.
18. Yunes R. A., Calixto J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001. 523p.
19. Sizum P., Auclair C., Lescot E., Paoletti C., Perly B., Fermandjian S. Stacking and edge-to-edge associations of antitumoral ellipticine derivatives are controlled in solution by interactions involving their nitrogen sites *Biopolymers.* 1988; 27: 1085-1096

LEGENDS

Figure 1: NO production in peritoneal macrophages stimulated with LPS and exposed to Fraction A and Fraction β , obtained from chloroformic extract of *Qualea multiflora*

Figure 2: TNF- α production in peritoneal macrophages stimulated with LPS and exposed to Fraction A and Fraction β , obtained from chloroformic extract of *Qualea multiflora*

Figure 3: IL-1 production in peritoneal macrophages stimulated with LPS and exposed to Fraction A and Fraction β , obtained from chloroformic extract of *Qualea multiflora*

Figure 4: IL-12 production in peritoneal macrophages stimulated with LPS and exposed to Fraction A and Fraction β , obtained from chloroformic extract of *Qualea multiflora*

Figure 5: IL-10 production in peritoneal macrophages stimulated with LPS and exposed to Fraction A and Fraction β , obtained from chloroformic extract of *Qualea multiflora*

Figure 6: Concentration of NF- κ B present in the nuclear fraction of peritoneal macrophages stimulated with LPS and exposed to Fraction A and to Fraction β , obtained from the chloroformic extract of *Qualea multiflora*.

TABLES

Table 1: Percentage of inhibition of production of NO, IL-1 e IL-12 in murine peritoneal macrophages activated with LPS and exposed to the chloroformic extract of *Qualea multiflora*.

	NO ($\mu\text{mol}/5.10^5\text{cells}$)	IL-1 (pg/mL)	IL-12 (pg/mL)
0.625 mg/mL	23.51%	8.01%	58.60%
0.125 mg/mL	26.81%	5.95%	31.52%
0.25 mg/mL	54.51%	4.52%	71.63%

Table 2: Values of IC₅₀ (mg/mL) for LM3 and LP07 cells after 48h incubation.

	LM3	LP07
Fraction A	0.310	0.276
Fraction β	0.270	0.199
Taxol [®]	0.184	0.121

Table 3: Cell viability of cellular cultures in 48 hours time spans.

	Peritoneal Macrophages	LM3	LP07
Fraction A (2 mg/mL)	99.25%	0%	0%
Fraction A (1 mg/mL)	88.68%	8.32%	12.48%
Fraction A (05 mg/mL)	90.10%	34.34%	32.65%
Fraction β (2 mg/mL)	73.34%	0%	0%
Fraction β (1 mg/mL)	67.90%	1.56%	3.71%
Fraction β (0.5 mg/mL)	61.87%	28.98%	20.54%
Negative control	100%	100%	100%