

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/07/2021.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Karoline Hagatha dos Reis

**Potencial Antifibrótico de Substâncias Bioativas Vegetais:
Viabilidade Celular e Atividade Funcional de Fibroblastos
Pulmonares Humanos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

**Botucatu
2019**

Karoline Hagatha dos Reis

**Potencial Antifibrótico de Substâncias Bioativas
Vegetais: Viabilidade Celular e Atividade Funcional de
Fibroblastos Pulmonares Humanos**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Reis, Karoline Hagatha dos.

Potencial antifibrótico de substâncias bioativas vegetais
: viabilidade celular e atividade funcional de fibroblastos
pulmonares humanos / Karoline Hagatha dos Reis. - Botucatu,
2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: James Venturini
Capes: 40101096

1. Extratos vegetais. 2. Fibrose pulmonar. 3.
Paracoccidioidomicose. 4. *Piper*.

Palavras-chave: Extratos vegetais; Fibrose pulmonar;
Paracoccidioidomicose; *Piper* .

Dedicatória

Aos pacientes portadores da paracoccidioidomicose/fibrose pulmonar, que este trabalho possa impactar, de alguma maneira, na melhora da qualidade de vida de cada um de vocês.

E também à todos alunos de pós-graduação e seus familiares que vivenciam a difícil realidade da pesquisa no nosso país.

Agradecimientos

Agradecimentos

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudos e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e grandes exemplos de vida, **Liene Daniel**, por abraçarem meus sonhos junto comigo e não medirem esforços para que estes sejam realizados. Obrigada por todo amor e apoio durante essa árdua jornada que é a Pós-graduação.

Aos meus irmãos e grandes companheiros, **Aline e Daniel**, por sempre acreditarem em meu potencial e me apoiarem em todos os momentos.

Ao meu companheiro e grande amigo **Caio Goes** por trilhar mais este caminho ao meu lado com muito amor e compreensão. Obrigada pelas palavras de esperança nos momentos difíceis e por compartilhar a vitória de cada experimento bem sucedido. Saiba que você não me deixou desistir.

Ao meu **sogro Donizeti** e à minha **sogra Nilva** por acompanharem de perto essa trajetória dando todo apoio necessário e por nunca duvidarem da minha capacidade.

Ao meu orientador **Prof. Dr. James Venturini** por todos os ensinamentos acadêmicos e pessoais. Obrigada por todos os puxões de orelha e elogios. Saiba que te tenho como exemplo e te desejo muito sucesso. Sem você esse trabalho não seria possível.

À **Profa Dra. Maria Sueli** por me acolher tão bem ao LIPE, onde tive meu primeiro contato e me apaixonei pela ciência.

Às minhas veteranas de LIPE **Thaís Fraga, Camila Marchetti, Débora Almeida, Angela Finato, Amanda Ribeiro e Babi Amorim** por toda paciência e dedicação para me ensinarem muito do que sei. Saibam que vocês são minhas inspirações acadêmicas e pessoais.

Um agradecimento especial às “chefinhas” **Amanda, Débora e Babi**, por todo apoio prático e teórico durante esses anos, além de me ensinarem valores que levarei para a vida. Saiba que admiro muito vocês.

À minha fiel companheira de jornada **Thainá Paixão** por todo apoio prático e psicológico. Durante esses dois anos pudemos compartilhar aprendizados e frustrações. Crescemos juntas. Saiba que você foi meu presente da pós-graduação e que independente do caminho que seguirmos, levarei você no coração e lembrarei dessa jornada com muito carinho.

Aos Lipeanos e amigos **Júlia Aguiar, Laysla Leite, Gabryelle Biazon, Victor Quinhones, Angela Liberali, Adriely Primo, Vitória Caroline, Luiz Gustavo, Silas Matheus e Jonatas Périco** por compartilharem inúmeras conquistas e frustrações do mundo acadêmico e vida pessoal. Saibam que vocês são muito especiais. Um agradecimento especial à **Gaby e Angelinha** por dividirem comigo as aventuras da Iniciação Científica, me proporcionarem a experiência de ensinar o que sei e, mesmo à distância, permanecerem ao meu lado durante a Pós-graduação.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima e Dpto de Química (Unesp Bauru) pelo acolhimento e suporte nos momentos de sufoco.

À Profa Dra. Maria Renata e ao Prof. Dr. Daniel Rinaldo por todo apoio e suporte na etapa final do trabalho.

Ao Laboratório de BioCel e às funcionárias Beatriz Sartori, Adriana por compartilharem bons momentos e inúmeras risadas, além do suporte prático na etapa final do trabalho.

À Profa Dra. Maysa Furlan por me acolher tão bem ao Laboratório de Biossíntese do NuBB e às suas alunas Vânia e Karina por todo tempo e atenção disponibilizado para me ensinarem sobre as técnicas de extração de extratos vegetais.

Às amigas e companheiras de laboratório Thainá, Débora e Adriely por compartilharem todo o estresse e angústia da etapa final desse processo. Obrigada por permanecerem ao meu lado e não me deixarem desistir.

Aos amigos Ana Júlia, Eduardo, Edgard, Ana Luísa, Lucas Lopes, Giovana, Angelinha e Raul por compartilharem as inseguranças e vitórias dessa trajetória. Vocês me fortaleceram o tempo todo.

Ao Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti e ao LaGenPe por abrir as portas sempre quando precisei.

Aos amigos de Pós-graduação Thiago, Bruna Gimenes, Giovana, Rafael e Rodrigo pela parceria e pelas viagens à Botucatu.

À amiga e instrutora de Pilates Miriany Rabanelli por todo apoio durante esses anos e por nunca duvidar da minha capacidade. Saiba que, além de inspiração pessoal/profissional, você é muito especial para mim.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação e à Bruna Quirino Jorgetto pela atenção a nós destinada.

Ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e a todos os funcionários da Faculdade de Medicina de Botucatu por toda atenção e ajuda quando necessário.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru.

A todos os amigos e colegas que de alguma forma ajudaram na concepção deste trabalho, mas que a memória insiste em falhar.

*“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que se ganha, mas
o que ele nos torna.”*

(John Ruskin)

Resumo

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etila/Ethyl acetate
AcOEtF: Fração acetato de etila/Ethyl acetate fraction
Balb/c: Linhagem de camundongo
BHI: Brain Heart Infusion ágar
CMX: Cotrimoxazol
CEUA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO: Dimetilsulfóxido
EBEtOH: Extrato bruto etanólico
EtOH: Etanol
FA: Forma aguda
FC: Forma crônica
FcR: Receptor Fc
FGFb: Fator de crescimento de fibroblasto básico/ Basic fibroblast growth factor
FR: Forma residual
GPY: Glucose-peptone-yeast extract agar
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
Hex: Hexano/Hexane
HexF: Fração hexânica/Hexane fraction
HF: Fração hidroalcoólica/Hydroalcoholic fraction
IFN- γ : Interferon-gamma
Ig: Imunoglobulina
IL: Interleucina
ITC: Itraconazole
L-929: Linhagem celular de fibroblastos derivados de adipócitos murinos
MEC: Matriz extracelular/extracellular matrix
MDMs: Macrófagos derivados de monócitos humanos/Human monocyte-derived macrophages
MMP: Metaloproteinase de matriz
MIP1- α : Proteína inflamatória de macrófagos-alpha/macrophage inflammatory protein
MRC-5: Linhagem celular de fibroblastos pulmonar humano
MTT: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
PBS: Solução salina tamponada com fosfato/Phosphate buffered saline
PCM: Paracoccidioidomicose
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas
PF: Fibrose pulmonar/Pulmonary fibrosis
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
SBF: Soro bovino fetal/Fetal bovine serum
SMZ-TMP: associação sulfametoxazol-trimetropim
TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta
Th: T helper
THP-1: Linhagem celular de monócitos humanos
TIMP: Inibidor tecidual de metaloproteinase/Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF- α : Fator de necrose tumoral-alpha
 α -SMA: Alpha-actina de músculo liso/Alpha-Smooth Muscle Actin

Resumo

dos Reis, K. H. **Potencial antifibrótico de substâncias bioativas vegetais: viabilidade celular e atividade funcional de fibroblastos pulmonares humanos.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*; suas principais formas clínicas são aguda/subaguda e crônica (FC). Apesar do tratamento antifúngico ser eficaz, a maioria dos paciente com a FC da doença apresentam sequelas, incluindo fibrose pulmonar. Sabe-se que o estabelecimento da fibrose na PCM é um processo precoce e sua relação com o tratamento antifúngico não é bem esclarecido. As plantas possuem o chamado metabolismo secundário e, portanto, são utilizadas para fins terapêuticos desde os primórdios. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar novos candidatos terapêuticos com propriedades anti-fibróticas frente a fibroblastos pulmonares humanos a partir de espécies do gênero *Piper*, *Peperomia*, *Davilla*, *Eugenia* e *Silybum*. Além de avaliar o efeito da associação da silimarina ao antifúngico cotrimoxazol (CMX) em modelo experimental murino da PCM. Nossos resultados demonstraram potencial pró-fibrótico das espécies *Piper aduncum*, *Piper gaudichaudianum* e *Piper arboreum*, induzindo maior produção de pró-colágeno I em fibroblastos pulmonares humanos. Entretanto, o alcaloide/amida comumente isolado do gênero *Piper*, a piplartina, apresentou potencial anti-fibrótico, reprimindo a produção de pró-colágeno 1. Além de verificarmos que a associação da silimarina e CMX exibe um potencial antifibrótico e uma resposta pró Th1. Por outro lado, a silibinina isolada, componente majoritário da silimarina, não apresentou diferença quanto a produção de pró-colágeno 1. Nossos resultados são promissores, uma vez que demonstram pela primeira vez o efeito protetor da piplartina na fibrose pulmonar e o uso da combinação terapêutica silimarina e CMX no tratamento da PCM pulmonar.

Palavras-Chave: Extratos vegetais; Fibrose pulmonar; Paracoccidioidomicose; *Piper*.

Abstract

dos Reis, K. H. **Antifibrotic potential of plant bioactive substances: functional and cellular viability of human pulmonary fibroblasts. 2019.** Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is systemic mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*; its main clinical forms are acute/subacute and chronic (CF). Although antifungal therapy is effective, most patients with CF suffer from sequelae, including pulmonary fibrosis. It is known that the establishment of fibrosis in PCM is an early process and its relation to antifungal treatment is not well understood. Plants have the secondary metabolism and have been used for therapeutic purposes since the earliest. In this context, the present study aims to identify new therapeutic candidates with antifibrotic properties against human pulmonary fibroblasts from species of the genus *Piper*, *Peperomia*, *Davilla* and *Eugenia*. In addition to evaluating the effect of silimarine in association with CMX in murine experimental model of PCM. Our results demonstrated the pro-fibrotic potential of the species *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum* and *P. arboreum*, inducing greater pro-collagen I production in human lung fibroblasts. However, the compound isolated piplartine presented antifibrotic potential, upregulating the production of pro-collagen 1. In addition, we find that the association of silymarin the herbal antifungal CMX demonstrated antifibrotic potential and a response pro Th1. However, isolated silibinin does not presented difference of production of pro-collagen 1. Our results are promising, as they demonstrate for the first time the protective effect of piplartine on pulmonary fibrosis and the use of the therapeutic combination silymarin and CMX in the treatment of pulmonary PCM.

Keywords: Plant extracts; Pulmonary fibrosis; Paracoccidioidomycoses; *Piper*.

Sumário

Revisão de Literatura.....	16
Objetivos.....	26
Referências bibliográficas.....	27
Manuscrito I.....	36
Manuscrito II.....	60
Conclusão	81

Capítulo I

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Paracoccidioidomicose

Descrita em 1908 por Adolfo Lutz, a paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, granulomatosa, causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* (1). Este gênero era composto inicialmente por duas espécies: *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, sendo o último composto por um complexo de cinco agrupamentos filogenéticos classificados como espécies crípticas: S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4 (2-3). Entretanto, Turissini et al. (4), baseado em estudos de genealogia genética nuclear e mitocondrial, propuseram três novas espécies para PS2, PS3 e PS4, sendo *P. americana*, *P. restrepienses* e *P. venezuelensis*, respectivamente. Além disso, esses autores englobaram as espécies S1a e S1b como *P. brasiliensis*. De qualquer modo, as mudanças propostas corroboraram com as distribuições das espécies, uma vez que as espécies crípticas S1a e S1b estão amplamente distribuídas pela América do Sul (1,3,5); a espécie *P. americana* (PS2) foi encontrada na Venezuela e no sudeste do Brasil (1-2,6); as espécies *P. restrepienses* e *P. venezuelensis* (PS3 e PS4) são endêmicas da Colômbia e Venezuela, respectivamente (2,7). Contudo, vale ressaltar que é difícil de estabelecer a incidência real de cada espécie filogenética e sua implicação na prática (8).

A PCM é uma doença geograficamente restrita à América Latina e no Brasil, foi considerada a oitava maior causa de mortalidade dentre todas as doenças crônicas e parasitárias, apresentando a maior mortalidade entre as micoses sistêmicas (9). No entanto, o nicho ecológico dos fungos *Paracoccidioides* spp. continua sendo desconhecido. O fungo foi poucas vezes isolado do solo e o único reservatório natural conhecido do *P. brasiliensis* é o tatu da espécie *Dasypus novemcinctus* (10-11).

Profissões ou atividades relacionadas com o manejo de solos contaminados com o fungo (ex: agricultura, terraplanagem, preparação do solo, transporte de vegetais e jardinagem) são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença **(12)**. Desnutrição, tabagismo e o consumo de álcool também são fatores de risco para a PCM **(9,13)**. A infecção por *Paracoccidioides* spp. ocorre pela via respiratória após a inalação de conídeos e/ou fragmentos de hifas (forma infectante) suspensos no ar **(14)** que atingem os pulmões e se transformam em formas leveduriformes (forma patogênica) **(15)**.

As principais formas clínicas da PCM são a forma aguda/sub-aguda (FA), forma crônica (FC) e forma residual (FR). A FA, também chamada juvenil, em geral compromete crianças, adolescentes e adultos jovens, apresenta história clínica de curta duração (mediana de dois meses) e exibe manifestações clínicas compatíveis com o comprometimento de órgãos do sistema fagocítico mononuclear (fígado, baço e linfonodos). A FC, em geral, compromete adultos com mais de 30 anos de idade, que apresentam doença de longa duração (em geral acima de seis meses), acometendo pulmões e mucosa das vias aerodigestivas superiores com grande frequência. Muitos pacientes apresentam sequelas após tratamento da PCM, as quais constituem a FR **(16)**.

O tratamento da doença é realizado com derivados azólicos, como cetoconazol, fluconazol e itraconazol (ITC) e associação sulfametoxazol-trimetoprim (SMZ-TMP), também denominada cotrimoxazol (CMX); a anfotericina B é reservada para os casos mais graves **(12)**. O ITC é atualmente a melhor escolha para o tratamento da PCM **(17)**. Entretanto, no Brasil o CMX possui distribuição gratuita no Sistema Único de Saúde e por isso continua sendo amplamente empregado no tratamento da PCM.

1.2. Fisiopatologia e imunidade na PCM

Os pulmões constituem a porta de entrada habitual do *Paracoccidioides* spp no organismo humano e a resposta imune do indivíduo pode variar de acordo com a carga genética, gênero, estado nutricional, tamanho do inóculo e virulência da cepa inalada **(18)**.

A morte do *Paracoccidioides* spp ocorre pela ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzido pelos macrófagos, que são potencializados pela resposta imune adaptativa do tipo T-helper 1 (Th₁), caracterizada pela alta produção de IFN-γ induzida/potencializada pela ativação de linfócitos que são atraídos para o sítio da lesão **(19,20)**. Qualquer deficiência ou alteração nesse processo leva ao estabelecimento da doença e a sua progressão.

As manifestações clínicas da PCM variam de acordo com o tipo de resposta imune desenvolvida pelo paciente **(21,22)**. Em alguns casos, devido à incapacidade de desenvolvimento de resposta efetiva Th₁, ocorre um desvio para outros padrões de respostas imunológicas **(18,21)**. Dessa forma, existindo comportamentos imunológicos distintos nas FA e FC da doença.

Na FA, observa-se predomínio da produção de citocinas do perfil Th₂/Th₉ (IL-4, IL-5 e IL-9), também denominada de resposta imune humoral. A resposta imune humoral não é efetiva para a doença, pois a produção elevada dessas citocinas acentua a deficiência da resposta imune celular, resultando na não reatividade a antígenos de *Paracoccidioides* spp. Além disso, tais citocinas induzem alta produção de anticorpos do isotipo IgG4, IgA e IgE **(18,23)**. Estes isotipos de anticorpos apresentam capacidade reduzida de fixação do complemento e baixa afinidade com os receptores FcR presentes nos fagócitos, resultando baixo nível de fagocitose pelos macrófagos e subsequente multiplicação e disseminação fúngica.

A FC, que ocorre devido à reativação de focos latentes e, portanto, após o hospedeiro ter organizado uma resposta imune adaptativa eficiente frente ao *Paracoccidioides* spp, apresenta instalação lenta e progressiva. À exceção dos que apresentam a forma grave, pacientes com a FC apresentam resposta Th₁ preservada, isto é, à semelhança de indivíduos saudáveis, são reativos ao teste intradérmico com paracoccidioidina. Apresentam ainda, intensa produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-17 e de peróxido de hidrogênio. Embora esses mediadores sejam importantes para a eliminação do fungo, sua superprodução induz efeitos deletérios e não conferem proteção. A produção de anticorpos também pode estar elevada, e se caracteriza por imunoglobulinas dos isotipos IgG1 e IgG2 (24), que possuem maior capacidade de fixação de complemento e maior afinidade pelos receptores FcR (IgG1 > IgG2 > IgG4). Embora esse conjunto de elementos seja importante para a eliminação do fungo, a capacidade de lise microbiana não acompanha a multiplicação do fungo e o indivíduo adoece. Por se tratar de processo inflamatório crônico, esses pacientes, em geral, já apresentam fibrose logo no primeiro atendimento clínico, quando se observa produção mais acentuada de TGF- β ₁ e do fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb) (23).

1.3. Fibrose Pulmonar e PCM

Ainda hoje o tratamento da PCM apresenta enormes desafios, com frequentes recaídas e sequelas debilitantes (25). É um tratamento longo, pode variar de nove a dezoito meses, com avaliações clínicas, imunológicas e radiológicas frequentes dos pacientes (12). As sequelas pulmonares são as de maior prevalência e incluem a fibrose pulmonar e o enfisema. Essas sequelas levam ao comprometimento funcional e incapacitação do paciente. Após tratamento, a função pulmonar poucas vezes é normal,

revelando padrão obstrutivo em 85% dos casos, com frequências iguais de obstrução leve, moderada e intensa (25,26), interferindo na qualidade de vida do paciente (27).

Apesar da sua importância, poucos estudos têm focado especificamente a fibrogênese pulmonar que ocorre na PCM. Cock et al. (28) demonstraram em modelo experimental murino que esse processo é precoce. Araujo (29), em estudos necroscópicos demonstrou a presença de fibrose em pacientes que não receberam tratamento antifúngico. Tuder et al. (30) observaram presença de deposição de fibras reticulares no septo alveolar em áreas distantes da lesão granulomatosa, e assim, os autores sugeriram a possibilidade de componentes do próprio fungo atuarem no processo de fibrogênese. Venturini et al. (31) demonstraram que a produção de TGF- β_1 e FGFb por monócitos de pacientes com FC da doença já se encontra elevada no momento do diagnóstico; em outro estudo, foi demonstrado que após a introdução do tratamento antifúngico, ocorre um aumento dos níveis plasmáticos de PDGF, um fator de crescimento envolvido na fibrose (32). Em um estudo recentemente finalizado, nosso grupo observou que o momento do início do tratamento é o momento-chave para o desenvolvimento de fibrose pulmonar em maior nível (33). Entretanto a relação entre o tratamento antifúngico e o desenvolvimento da fibrose continua incerto.

1.4. Reparo tecidual e fibrose

Todos os organismos vivos possuem mecanismos para responder a estímulos agressivos. Agressões teciduais de qualquer natureza desencadeiam de imediato uma série de eventos, cujo objetivo é impedir danos ao organismo e restabelecer a integridade tecidual (34). Esta cascata de eventos é chamada de cicatrização e nos humanos acontece devido aos mecanismos de reparo tecidual (35).

O reparo tecidual pode ser dividido em três fases: (1) inflamação, (2) formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular (MEC) e (3) remodelação (36). No tecido de granulação os fibroblastos são as células mais abundantes, devido à alta concentração de TGF- β no microambiente (37), fator de crescimento relacionado à proliferação de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos (38). Essas células secretam MEC e proteínas incluindo colágeno e fibronectina (34,35,37-40), acarretando remodelação da MEC e, conseqüentemente, resolução completa da ferida. Miofibroblastos também expressão α -SMA, proteína que integra filamentos de actina e, o aparecimento precoce dessas células na cicatrização sugerem papel importante na evolução dos eventos pró-fibróticos (41).

O fator de crescimento de fibroblastos básico (FGFb) é outro mediador que desempenha papel fundamental para esse processo. O FGFb é um importante fator mitogênico para diferentes tipos celulares presentes no tecido lesionado, como fibroblastos e queratinócitos (42). Além da proliferação, o FGFb pode regular a síntese e a deposição de componentes da MEC, incluindo colágeno e fibronectina (43). Esse processo é fundamental para a sobrevivência de todos os organismos. No entanto, se desregulado pode levar ao desenvolvimento de fibrose patológica ou cicatrização permanente (41), prejudicando a função normal do tecido. Em alguns casos, pode evoluir para falência de órgãos e/ou morte.

A fibrose pulmonar pode ser resultado de muitos tipos de lesão pulmonar ou inflamação, caracterizada pelo acúmulo de células fibroblásticas e proteínas da MEC (41), seus mecanismos de indução permanecem mal definidos, porém, acredita-se que seja resultado da desregulação no remodelamento da MEC, acarretando em um acúmulo excessivo da mesma. A renovação do colágeno e o remodelamento da MEC são regulados por várias metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores, que incluem os inibidores

teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (39). Mudanças na síntese e catabolismo da MEC regulam o aumento ou diminuição do colágeno dentro da ferida. A fibrose ocorre quando o colágeno sintetizado por fibroblastos e miofibroblastos excede a taxa na qual ele é degradado (40,44).

Pacientes com fibrose pulmonar apresentam uma queda em sua qualidade de vida, devido alterações em suas funções respiratórias, incapacitando-os de exercerem suas profissões e atividades (45). Na PCM, esse quadro é ainda pior, pois a maioria dos pacientes da forma crônica são trabalhadores rurais em sua fase ativa de trabalho, podendo acarretar graves problemas socioeconômicos, como, por exemplo, doenças psicológicas e intensificar o quadro de alcoolismo.

1.5. Espécies vegetais com potencial terapêutico

As plantas são utilizadas como medicamentos desde os tempos pré-históricos (46), acredita-se que uma das primeiras formas de utilização tenha sido a busca por alívio e cura de doenças (47). Inúmeras espécies utilizadas na medicina popular despertam interesse não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica e cosmética (47). Sendo assim, é de nosso interesse estudar espécies comumente utilizadas na medicina popular no tratamento de diferentes complicações.

A família Piperaceae pertence à ordem Piperales e está classificada entre as Angiospermas mais basais (48), compreende cerca de 4000 espécies e são encontradas em regiões tropicais e subtropicais (49). Atualmente, esta família está dividida em cinco gêneros: *Piper* L., *Peperomia* Ruiz e Pavon, *Manekia* Trel., *Zippelia* Blume e *Verhuellia* (50), sendo os gêneros *Piper* e *Peperomia* considerados os mais representativos da família, com aproximadamente 2000 e 1700 espécies, respectivamente (49).

Espécies da família Piperaceae são utilizadas na medicina popular no tratamento de complicações hepáticas e renais, queixas estomacais, resfriado, gastrite, como anti-inflamatório, entre outras (51,52). Diversas classes de metabólitos secundários, como alcaloides/amidas, derivados do ácido benzóico, lignanas e terpenos presentes em tais espécies são apontados como os possíveis responsáveis por sua atividade biológica (53). Estudos biológicos demonstraram que espécies da família Piperaceae possuem atividades tripanocida (50), leishmanicida (54), antibacteriana (55), antifúngica (53,56,57) e potenciais anti-viral (58) e anti-tumoral (59). Recentemente, espécies da família Piperaceae também estão sendo estudadas para controle de vetores (60,61) e pragas (62). Apesar desses achados, pouco se conhece sobre a ação *in vivo* destes extratos sobre o sistema imunológico.

Além das espécies da família Piperaceae, as espécies *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki e *Davilla elliptica* A. St.-Hil. e espécies do gênero *Eugenia* também são utilizadas na medicina popular. Entretanto, tais espécies são utilizadas para tratamento de problemas gástricos.

Kushima et al. (63) demonstraram que o extrato metanólico de *Davilla nitida* foi capaz de proteger a mucosa gástrica em diversos modelos de indução de úlceras e apresentou atividade bactericida contra *Helicobacter pylori*. Além de seu extrato etanólico apresentar atividade bactericida contra diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas (64). Estudos fitoquímicos relatam que espécies do gênero *Davilla* apresentam composição similar: flavonoides, taninos condensados e ácido gálico (63,65,66). Espécies do gênero *Eugenia* são utilizadas na medicina popular para curar distúrbios digestivos e também como anti-febril, anti-inflamatório e diurético (67). Estudos fitoquímicos relatam flavonoides e taninos como componentes majoritários de *Eugenia* spp. (68,69).

A espécie *Silybum marianum* (L.) Gaertn., também conhecida como Cardo Mariano, pertence à família *Asteraceae* (70) e tem sido objeto de diversos estudos, devido interessante, anticarcinogênica (71), antifibrótica (72), antioxidante e anti-inflamatória (73). Tal espécie é utilizada na medicina popular contra problemas hepáticos (74) e, atualmente, também possui sua atividade hepatoprotetora bem descrita (70). Extratos padronizados secos de seus frutos e sementes já vem sendo utilizados em diversos tratamentos de doenças com diferentes etiologias em humanos (75). Seu potencial benéfico se dá pela alta concentração de silimarina em sua composição, flavonoide mais prevalente (76).

1.6. Compostos isolados de espécies vegetais

Sabe-se que as plantas apresentam o chamado metabolismo secundário (77), responsável pela produção de diversas substâncias que permitem sua adequação ao meio, assegurando sua sobrevivência (78). É provável que a sua importância ecológica tenha alguma relação com potencial efeito medicinal para os seres humanos (78,79). No entanto, a farmacologia e mecanismo de ação destes produtos são objetos de estudo até os dias atuais (80). Estudos biomonitorados são importantes ferramentas para a identificação dos compostos biologicamente ativos presentes no alvo de estudo, possibilitando o isolamento e uso terapêutico de tais substâncias.

A Piplartina é um alcaloide/amida comumente encontrada em espécies do gênero *Piper* (81). Na literatura há relatos de diversas atividades, entre elas destacam-se atividade gastroprotetora (82), leishmanicida (83), schistossomida (84), imunomodulador (85), entre outros. Além de relatos do seu efeito no processo de reparo tecidual (86,87) e fibrose cardíaca (88).

A silimarina é um flavonoide isolado da espécie *Silybum marianum* (89) e é composta por três flavolignanas (silibinina, silidianina e silicristina), sendo a silibinina o componente com maior atividade biológica (90), a qual tem sido avaliada em diferentes contextos, incluindo a fibrose hepática (91).

A busca por novos fármacos é uma constante necessidade da sociedade moderna com o intuito de se obter drogas para tratamento de doenças ainda sem tratamento, com efeito potencializado e reduzidos efeitos colaterais. Introduzir um novo fármaco na área terapêutica é um processo longo e bastante oneroso (92). O desenvolvimento de uma nova droga é dividido em várias etapas que incluem: (1) descoberta/caracterização de um composto com atividade terapêutica; (2) estudos pré-clínicos e (3) estudos clínicos.

Atualmente, sabe-se que o uso de plantas sem estudos prévios podem causar toxicidade e/ou acarretar diversos problemas para animais e humanos, devido a ampla variedade de metabólitos secundários produzidos por essas espécies (93), sendo necessário à investigação da farmacologia destes metabólitos. Portanto, o presente estudo utiliza modelo *in vitro* de fibrose pulmonar, com o uso de linhagem de fibroblasto pulmonar humano, permitindo identificar novas drogas com potencial antifibrótico. Para o presente estudo serão empregados diferentes materiais vegetais das espécies *Davilla nitida*, *Eugenia speciosa*, *Silybum marianum* e espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antifibrótico, *in vitro*, de substâncias bioativas vegetais sobre viabilidade celular e atividade funcional de fibroblastos pulmonares humanos e, *in vivo*, em associação ao cotrimoxazol na paracoccidiodomicose.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a viabilidade celular de fibroblastos pulmonares desafiados com as substâncias bioativas vegetais.
- Caracterizar a atividade funcional de fibroblastos pulmonares humanos desafiados com as substâncias bioativas vegetais a partir da produção de pró-colágeno I.
- Avaliar a influência do tratamento antifibrótico sobre a produção das citocinas TGF- β 1, MIP1- α , IFN- γ , TNF- α e IL-10 envolvidas no processo inflamatório nos pulmões.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* agosto de 2009;52(2):273–83.
2. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2005;23(1):65-73.
3. Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, et al. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere.* 2016;1(5):e00213-16.
4. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.* 1o de setembro de 2017;106:9–25.
5. Theodoro RC, Teixeira MM, Felipe MSS, Paduan KS, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One.* 2012;7(5):e37694.
6. de Macedo PM, Almeida-Paes R, de Medeiros Muniz M, Oliveira MM, Zancoppe-Oliveira RM, Costa RL, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* PS2: first autochthonous paracoccidioidomycosis case report in Rio de Janeiro, Brazil, and literature review. *Mycopathologia.* 2016;181(9-10):701-8.
7. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MS. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog.* 2014;10(10):e1004397.
8. Queiroz-Júnior LP, Camargo ZP, Tadano T, Rodrigues AM, Takarara DT, Gegembauer G, et al. Serological and antigenic profiles of clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil. *Mycoses.* 2014;57(8):466-72.
9. Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev Saúde Pública.* fevereiro de 1992;26(1):12–6.
10. Bagagli E, Franco M, Bosco SDMG, Hebel-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol.* junho de 2003;41(3):217–23.
11. Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Pará State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* fevereiro de 1986;28(1):19–27.

12. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30 de junho 2017. Doi: 10.1590/0037-8682-0230-2017.
13. dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad Saude Publica.* fevereiro de 2003;19(1):245–53.
14. Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* setembro de 2015;57(19):11-20.
15. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Trop. Med. Mycol.* 1993;5:115–49.
16. Franco M, Montenegro MR, Mender RP, Marques AS, Dillon N, Mota NG da S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* abril-junho 1987;20(2):129-132.
17. Cavalcante R de S, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between itraconazole and cotrimoxazole in the treatment of paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8: e2793. doi:10.1371/journal.pntd.0002793.
18. Fortes MRP, Miot HÁ, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques AS. Immunology of paracoccidioidomycosis. *Na Bras Dermatol.* 2011;86(3):516-25.
19. Carmo JPM, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H2O2-dependent mechanism. *Med Mycol.* junho de 2006;44(4):363–8.
20. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-g and tumor necrosis factor-α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* 2000;156:1811–20.
21. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008;165: 209–221.
22. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH de SL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* novembro de 2013;67(5):470–85.
23. Juvenale M, Del Negro GM, Duarte AJ, Benard G. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol.* 2001;50: 127–134.
24. Mota NG, Peraçoli MT, Mendes RP, Gattass CR, Marques SA, Soares AM, et al. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* abril de 1988;26(2):105–11.

25. Campos EP, Cataneo AJ. Pulmonary function in 35 patients with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. outubro de 1986;28(5):330–6.
26. Campos EP, Padovani CR, Cataneo AM. Paracoccidioidomycosis: radiologic and pulmonary study in 58 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. agosto de 1991;33(4):267–76.
27. Ambrósio AVA, Camelo CCS, Barbosa CV, Brazões FA de S, Rodrigues LF, Aguiar RA, et al. Paracoccidioidomycosis (Lutz-Splendore-Almeida disease): treatment, duration of treatment, recurrence, paradoxical reaction, prognosis, prophylaxis. *Rev Med Minas Gerais* 2014; 24(1): 71-77
28. Cock AM, Cano LE, Vélez D, Aristizábal BH, Trujillo J, Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable paracoccidioides brasiliensis propagules. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. abril de 2000;42(2):59–66.
29. Araujo S. Contribuição ao estudo anátomo-clínico da paracoccidioidomicose em Minas Gerais. Meio século de experiência – Avaliação das necropsias realizada no período compreendido entre 1944 até 1999, no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais [Dissertação]. Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.
30. Tuder RM, el Ibrahim R, Godoy CE, De Brito T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. dezembro de 1985;92(3):179–88.
31. Venturini J, Cavalcante R, de Assis Golim M, Marchetti C, de Azevedo P, Amorim B, et al. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. *BMC Infect Dis*. 16 de outubro de 2014;14(1):552.
32. Venturini J, Cavalcante RS, Sylvestre TF, dos Santos RF, Moris DV, Carvalho LR, et al. Increased peripheral blood TCD4+ counts and serum SP-D levels in patients with chronic paracoccidioidomycosis, during and after antifungal therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. novembro 2017;112(11):748-55.
33. dos Santos AR. Identificação de biomarcadores na fibrogênese pulmonar da paracoccidioidomicose [Dissertação]. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2018.
34. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol*. 2001;22: 199–204.
35. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Ver. Bras. Ciên Farm*. jan/mar 2005;41(1):27-51.

36. Clark RAF. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. Invest. Dermatol. 1993;11:647-661.
37. Khalil N, Bereznayj O, Sporn M, Greenberg AH. Macrophage production of transforming growth factor β and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. The Journal of Experimental Medicine. september 1989;170:727-37.
38. Richards CD. Innate Immune Cytokines, Fibroblast Phenotypes, and Regulation of Extracellular Matrix in Lung. Journal of interferon & cytokine research. 2017;37(2):52-61.
39. Whynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol. janeiro 2008; 214(2):199–210.
40. Whynn TA & Vanella CM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. Immunity. march 2016;44:450-62.
41. Xing Z, Tremblay GM, Sime PJ, Gauldie J. Overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces pulmonar granulation tissue formation and fibrosis by induction of Transforming Growth Factor- β 1 and myofibroblast accumulation. Am J of Pat. january 1997;150(1):59-66.
42. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn A. Growth Factor Regulation of Fracture Repair. J of bone and mineral research. 1999;14(11):1805-15.
43. Wahl SM, Wong H, McCartney-Francis N. Role of growth factors in inflammation and repair. J of Cell Bioc. 1989;(40)193-199.
44. Todd NW, Luzina IG, Atama, SP. Molecular and cellular mechanisms of pulmonar fibrosis. Fibrogenesis & Tissue Repair. 2012;5:11.
45. Tobón AM, Agudelo CA, Osorio ML, Alvarez DL, Arango M, Cano LE. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic Paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after Itraconazole therapy. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1o de outubro de 2003;37(7):898–904.
46. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The Traditional medicine and modern medicine from natural Products. Molecules. march 2016;21:559;doi:10.3390/molecules21050559.
47. Pereira RJ, Cardoso MG. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. J. Biotec. Biodivers. nov. 2012;3(4):146-52.
48. Kato MJ & Furlan M. Chemistry and Evolution of the Piperaceae. Pure Appl. Chem. 2007;79(4):529-38. doi: 10.1351/pac200779040529.
49. Cotinguiba F, López SN, Budzinski IGF, Labated CA, Kato MJ, Furlan M. Proteomic profile of *Piper tuberculatum* (Piperaceae). Braz. J. Biol. 2018;78(1):117-124. Doi: 10.1590/1519-6984.07816.

50. Batista Jr. JM, Batista ANL, Rinaldo D, Vilegas W, Cicarelli RMB, et al. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. *J. Nat. Prod.* april 2011;74:1154–1160. Doi: 10.1021/np200085h.
51. Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Kakinami SH. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia.* 2002;73:69-91.
52. Giraldi M & Hanazaki N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. *Acta bot.* 2010;24(2):395-406.
53. de Campos MP, Cechinel Filho V, da Silva RZ, Yunes RA, Zacchino S, Juarez S, et al. Evaluation of Antifungal Activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Biol. Pharm. Bull.* august 2005;28(8):1527—1530.
54. Bernuci KZ, Iwanaga CC, Fernandez-Andrade CMM, Lorenzetti FB, Torres-Santos EC, Faiões V dos S, et al. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. *Molecules.* 2016;21:1698. doi:10.3390/molecules21121698.
55. Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2004;14(01):06-08. ISSN: 0102-695X.
56. Almeida AC, Azevedo MMB, Chaves FCM, de Oliveira MR, Rodrigues IA, Bizzo HR, et al. *Piper* essential oils inhibit *Rhizopus oryzae* growth, biofilm formation, and Rhizopuspepsin activity. *Canadian J of Infect. Dis. And Med. Microb.* 2018. ID: 5295619. Doi: 10.115/2018/5295619.
57. Silva RV, Navickienea HMD, Kato MJ, Bolzani V da S, Méda CI, Young MC, et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry.* 2002;59:521-27.
58. Jardim ACG, Igloi Z, Shimizu JF, Santos VAFFM, Felipe LG, Mazzeu BF, Amako Y, et al. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potente inhibitors of hepatitis C vírus replication in vitro. *Antiviral Research.* 2015;115:39–47. Doi: 10.1016/j.antiviral.2014.12.018.
59. Atiya A, Sinha BN, Lal UR. New chemical constituents from the *Piper betle* Linn. (Piperaceae). *Natural Product Research.* 2017. Doi: 10.1080/14786419.2017.1380018.
60. Rapado LN, Freitas GCF, Polpo A, Rojas-Cardozo M, Rincón JV, Scotti MT. A Benzoic acid derivative and flavokawains from *Piper* species as Schistosomiasis Vector Controls. *Molecules.* april 2014;19:5205-18. Doi: 10.3390/molecules19045205.
61. Silva LS, Mar JM, Azevedo SG, Rabelo MS, Bezerra JA, Campelo PH. Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* essential oils in gelatina

- nanoparticles: a possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. J Sci Food Agric 2018;99: 685–695. Doi: 10.1002/jsfa.9233.
62. Braga AGS, Barbiera F da S, Brito SG, Celestino CO, Costa TS, Faculdo VA. Atividade pesticida de extratos de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Haematobia irritans* L. Biota Amazonica. 2017;7(11):54-57.
 63. Kushima H, Nishijima CM, Rodrigues CM, Rinaldo D, Sassá MF, Bauab TM, et al. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-Helicobacter pylori action. J Ethnopharmacol. 25 de junho de 2009;123(3):430–8.
 64. Perim MC, Borges J da C, da Silva ML, Araújo TA de S, da Silva ANO, da Silva VC, et al. In vitro antibacterial and time-kill assay of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark on multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot lesion. feb 2018. Doi: 10.1080/14786419.2018.1443085.
 65. Rinaldo D, Silva MA, Rodrigues CM, Calvo TR, Sannomiya M, Santos LC dos, et al. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by high-speed counter-current chromatography. Química Nova. outubro de 2006;29(5):947–9.
 66. Rodrigues CM, Rinaldo D, Sannomiya M, dos Santos LC, Montoro P, Piacente S, et al. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. Phytochem Anal. fevereiro de 2008;19(1):17–24.
 67. Cole RA, Haber WA, Setzer WN. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. Biochemical Systematics and Ecology. 2007;35:877-86. doi:10.1016/j.bse.2007.06.013.
 68. Daniel KSG. Quantitative analysis of primary and secondary metabolites in aqueous hot extract of *Eugenia uniflora* (L.) leaves. Asian J Pharm. Clin. Res. 2015;8:334-38.
 69. Oliveira AL, Destandau E, Fougere L, Lafosse M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). 2014;145:522-29.
 70. Bahmani M, Shirzad H, Rafieian S, Rafieian-Kopaei M. *Silybum marianum*: Beyond Hepatoprotection. J Evid Based Complem. & Altern Med. 2015;20(4):292-301. Doi: 10.1177/2156587215571116.
 71. Singh S, Mehta A, Baweja S, Ahirwal L, Mehta P. Anticancer Activity of *Andrographis paniculata* and *Silybum marianum* on Five Human Cancer Cell Lines. J Phar and Tox. 2013;8(1):42-48.
 72. Mata-Santos HÁ, Lino FG, Rocha CC, Paiva CN, Branco MTLC, Pyrrho AS. Silymarin treatment reduces granuloma and hepatic fibrosis in experimental

schistosomiasis. *Parasitol Res.* 2010;107:1429–1434. DOI 10.1007/s00436-010-2014-8.

73. Razavi-Azarkhiavi K, Ali-Omrani M, Solgi R, Bagheri P, Haji-Noormohammadi M, Amani N, et al. Silymarin alleviates bleomycin-induced pulmonary toxicity and lipid peroxidation in mice. *Pharmaceutical Biology.* 2014;52(10):1267-1271. Doi: 10.3109/13880209.2014.889176
74. Dhiman RK & Chawla Y. Herbal Medicines for Liver Diseases. *Digestive Diseases and Sciences.* 2008;50(10):1807-12.
75. Greenlee H, Abascal K, Yarnell E, Ladas E. Clinical Applications of *Silybum marianum* in Oncology. *Integrative Cancer Therapies.* 2007;6(2):158-165.
76. Venezuela A & Garrido A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biol Res.* 1994;27:105-112.
77. Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia vegetal.* 5ª ed. Porto Alegre 2013.
78. Vizzotto M, Krolow ACR, Weber GEB. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. ISSN 1516-8840, documento 316. 2010.
79. López SN, Lopes AA, Batista Jr JM, Flausino Jr O, Bolzani V da S, Kato MJ, et al. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). *Bioresource Technology.* 2010;101:4251-60. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.041.
80. Bolzani V da S, Valli M, Pivatto M, Viegas C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure Appl. Chem.* 2012;84(9):1837-46. Doi: 10.1351.
81. Gorgani L, Mohammadi M, Najafpour GD, Nikzad M. Piperine—The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations. *Comp Rev. In Food Sci and Food Saf.* 2017;16:124-140.
82. Burci LM, Pereira IT, Silva LM, Rodrigues RV, Facundo VA, Militão JSLT, et al. Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and piplartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. *J Ethnoph.* 2013;148(1):165-174.
83. Moreira F, Riul T, Moreira M, Pilon A, Dias-Baruffi M, Araújo M, et al. Leishmanicidal Effects of Piperlongumine (Piplartine) and Its Putative Metabolites. *Planta Medica.* 2018; doi:10.1055/a-0614-2680
84. Moraes J, Nascimento C, Lopes POMV, Nakano E, Yamaguchi LF, Kato MJ, et. al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. *Exper. Paras.* 2011;127(2):357-364.

85. Park M-J, Lee D-E, Shim MK, Jang EH, Lee JK, Jeong SY. Piperlongumine inhibits TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition by modulating the expression of E-cadherin, Snail1, and Twist1. *European Journal of Pharmacology*. 2017. Doi: 10.1016.
86. Dong Y, Huihui Z, Chengzhang L. Piperine inhibit inflammation, alveolar bone loss and collagen fibers breakdown in a rat periodontitis model. *J Periodont Res*. 2015; doi: 10.1111/jre.12262.
87. Gong F, Cui L, Zhang X, Zhan X, Wen Y. Piperine ameliorates colagase-induced Achilles tendon injury in the rat. *Connective Tissue Research*. 2017; doi: 10.1008/03008207.2017.1289188.
88. Ma Z-G, Yuan Y-P, Zhang X, Xu S-C, Wang S-S, Tang Q-Z. Piperine Attenuates Pathological Cardiac Fibrosis Via PPAR- γ /AKT Pathways. *EBio Medicine*. 2016; doi: 10.1016.
89. Gaedeke J, Fels LM., Bokemeyer C, Mengs U, Stolte H, Lentzen H. Cisplatin nephrotoxicity and protection by silibinin. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11:55-62
90. Vargas-Mendonza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González A, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna M, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. 2014;6(3):144-149. doi:10.4254/wjh.v6.i3.144
91. Dehmlow C, Murawski N, Groot H. Scavenging of reactive oxygen species and inhibitor of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. **Life science**. 1996;58(18):1591-6000.
92. Ferreira FG, Polli MC, Oshima-Franco Y, Fraceto LF. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2009;6:14–24.
93. Valli M, Pivatto M, Danuello A, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Cavaleiro AJ et al. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? *Quim. Nova*. 2012;35(11):2278-87.

Conclusão

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. gaudichaudianum* apresentam potencial pró-fibrótico, através da indução da produção de pró-colágeno 1; Piplartina apresenta potencial antifibrótico, devido a repressão na produção de pro-colágeno 1; Silimarina associada ao CMX apresenta potencial antifibrótico e o composto silibinina não apresentou diferença quanto a produção de pró-colágeno 1.

Nossos resultados são promissores, pois sugerem, pela primeira vez, o uso da pipartina como antifibrótico no contexto pulmonar. Bem como, o uso da combinação terapêutica silimarina + CMX no tratamento da paracoccidioidomicose pulmonar.