

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DO EXTRATO DE *Calyptranthes grandifolia* O. Berg
(Myrtaceae) NA EXPRESSÃO DO TNF- α , NF- κ B E p38 α EM
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL (CACO-2)**

Geórgia Muccillo Dexheimer

Lajeado, dezembro de 2015

Geórgia Muccillo Dexheimer

**EFEITO DO EXTRATO DE *Calyptranthes grandifolia* O. Berg
(Myrtaceae) NA EXPRESSÃO DO TNF- α , NF- κ B E p38 α EM
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL (CACO-2)**

Projeto de pesquisa apresentado para
obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Adriane
Pozzobon

Coorientadora: Prof. Dra. Márcia Inês
Goettert

Lajeado, dezembro de 2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo meus pais, Luis e Raquel, pois sem o esforço deles nada disto seria possível. Agradeço pelo apoio e paciência em entender minhas angústias e acalentá-las sempre.

Agradeço meu marido, Eduardo, por ouvir diariamente assuntos do mestrado. Agradeço pela paciência, companheirismo e incentivo.

Agradeço também meu irmão e minha cunhada, Guilherme e Ângela, pelo incentivo. E minhas avós Reni (*In Memoriam*) e Solange (*In Memoriam*), que acompanharam boa parte da minha caminhada na pós-graduação e sempre me incentivaram.

Agradeço minha orientadora, Prof. Dra. Adriane Pozzobon, pela confiança, atenção e dedicação durante este trabalho. Também agradeço minha coorientadora, prof. Márcia Inês Goetttert, por ser sempre disponível e dedicada.

Agradeço ao prof. Vanderlei Biolchi e ao Me. Henrique Sullzbach de Oliveira pela contribuição e por serem sempre prestativos durante o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do projeto de cultura de células, em especial às colegas Débora Mara Kich e Dalana Faleiro, pelo auxílio e paciência. Também agradeço à Helouise Richardt Medeiros por acompanhar e colaborar nos experimentos da pesquisa.

Às meninas da Biologia Molecular, Amanda e Érica, sempre disponíveis e prestativas.

Agradeço aos professores da Biomedicina, que acompanharam esta minha caminhada.

Aos meus colegas de mestrado, que tornaram estes dois anos ainda mais especiais.

Agradeço à Univates, pelo comprometimento e seriedade com os alunos, e pela oportunidade.

À todos que, de alguma forma, participaram e acompanharam esta minha trajetória.

RESUMO

Terapias antitumorais baseadas em efeitos anti-inflamatórios vêm sendo consideradas no tratamento do câncer. A sobrevivência, proliferação e, eventualmente, invasão e metástase das células tumorais são reguladas por mediadores inflamatórios locais. Citocinas inflamatórias primárias, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), podem ser alvos para a terapia anticâncer. Diversos anti-inflamatórios isolados de produtos naturais vêm ganhando importância como quimiopreventivos e agentes terapêuticos para o câncer. O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão dos genes *TNF- α* , *NF- κ B* e *p38 α* , associados à proliferação e inflamação em células de linhagem Caco-2 tratadas com extratos etanólico e hexânico obtidos de *Calypttranthes grandifolia* O.Berg (Myrtaceae). Células Caco-2 foram cultivadas e tratadas com o extrato vegetal em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 25 μ g/mL), e estimuladas com LPS. Para análise da expressão gênica foi realizada a extração de RNA total pelo método de Trizol[®], seguido da síntese de DNAc (DNA complementar) e análise por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real). Dentre os genes avaliados, observou-se uma diminuição da expressão de *TNF- α* nas concentrações de 100 e 200 μ g/mL apenas no extrato etanólico ($p < 0,025$, ANOVA e Teste de Tukey). O gene *p38 α* apresentou uma tendência a aumento da expressão apenas no tratamento com extrato etanólico e o gene *NF- κ B* não apresentou variações significativas em ambos os extratos analisados. Pode-se concluir que o extrato etanólico pode apresentar atividade anti-inflamatória nas concentrações testadas através da diminuição de *TNF- α* . Contudo, estudos complementares como análises de genotoxicidade, proteína, dentre outras, devem ser realizadas a fim de confirmar o seu potencial efeito anti-inflamatório.

Palavras-chave: Inflamação, câncer, expressão gênica, qPCR, *Calypttranthes grandifolia*.

ABSTRACT

Anti-tumor therapies based on anti-inflammatory effects have been considered in cancer treatment. Survival, proliferation and, eventually, invasion and metastasis of tumor cells are regulated by local inflammatory mediators. Primary inflammatory cytokines, such as Tumor Necrosis Factor (TNF), can be targets for anticancer therapy. Several anti-inflammatory isolated from natural products are acquiring importance as chemopreventive and therapeutic agents for cancer. This study aimed to investigate the expression of *TNF- α* , *NF- κ B* and *p38 α* genes, associated with proliferation and inflammation in Caco-2 cell line treated with ethanolic and hexanic extracts of *Calypttranthes grandifolia* O.Berg (Myrtaceae). Caco-2 cells were cultured and treated with plant extract at different concentrations (200, 100, 50 and 25 ug/ml) and stimulated with LPS. For gene expression analysis was performed a total RNA extraction by Trizol® method, followed by the synthesis of cDNA (complementary DNA) and analysis by qPCR (Polymerase Chain Reaction in Real Time). Among the evaluated genes, there was a decrease in *TNF- α* expression in 100 and 200 ug/ml concentrations only on ethanolic extract ($p < 0.025$, ANOVA and Tukey test). The *p38 α* gene showed a tendency to increase expression only in treatment with ethanolic extract and *NF- κ B* gene did not present significant variations in both analyzed extracts. It can be concluded that ethanolic extract may present an anti-inflammatory activity on tested concentrations by decreasing *TNF- α* . However, further studies as genotoxicity analysis, protein, among others, should be performed to confirm its potential anti-inflammatory effect.

Keywords: inflammation, cancer, gene expression, qPCR, *Calypttranthes grandifolia*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LOX - 5- Lipoxigenase

ACTB - Beta Actina

c-IAP1 - *Cellular inhibitor of apoptosis protein-1*/ Proteína inibidora da apoptose celular 1

COX-2 - Ciclooxygenase-2

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNAC - DNA complementar

ELAM-1 - *Endothelium Leukocyte Adhesion Molecule 1*

FADD - *Fas-Associated with Death Domain*

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* / Fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos

IC50 - Concentração de Inibição Média

ICAM-1 - *Intercellular Adhesion Molecule 1*/ Molécula de adesão intercelular 1

IL - Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo;

MAd-CAM-1 - *Mucosal addressin cellular adhesion molecule-1*/ Molécula de adesão da célula de adressina da musocsa-1

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*/ Proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1 - *Monocyte Chemoattractant Protein-1*/ Proteína quimiotática de monócito

Mip-3 α - Proteína inflamatória de macrófago 3 α

NO - Óxido Nítrico

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa Beta

PBS - phosphate buffered saline/ Tampão fosfato-salino

PCR - *Polymerase Chain Reaction*/ Reação em cadeia da polimerase

RIP - Receptor de interação proteica

RNA - Ácido Ribonucleico

RNA_m - RNA mensageiro

RT-qPCR - *Quantitative reverse transcription PCR*/ PCR de Transcrição reversa quantitativa

SFB - Soro Fetal Bovino

TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha*/ Fator de necrose tumoral alfa

TNFR - *Tumor necrosis factor receptor*/ Receptor do fator de necrose tumoral

TRADD - *TNFR 1 associated death domain protein*/ Domínio de morte associado ao TNFR1

TRAF - *TNF receptor associated factors*/ Fatores associados ao receptor de TNF

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*/ Fator de crescimento endotelial vascular

VCAM - *Vascular cell adhesion molecule*/ Molécula de adesão celular vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das vias de sinalização do $TNF-\alpha$, $NF-\kappa B$ e $p38\alpha$	22
Figura 2 - Percentual de Viabilidade Celular pelo método de Alamar Blue	42
Figura 3 - Efeito do LPS na expressão do $TNF-\alpha$	43
Figura 4 - Efeito do LPS na expressão do $NF-\kappa B$	43
Figura 5 - Efeito do LPS na expressão do $p38\alpha$	44
Figura 6 - Gráfico representativo do efeito do extrato Etanólico (EtOH) na expressão do gene $TNF-\alpha$	44
Figura 7 - Gráfico representativo do efeito do extrato Etanólico (EtOH) na expressão do gene $NF-\kappa B$	45
Figura 8 - Gráfico representativo do efeito do extrato Etanólico (EtOH) na expressão do gene $p38\alpha$	46
Figura 9 - Gráfico representativo do efeito do extrato Hexânico na expressão do gene $TNF-\alpha$	47

Figura 10 - Gráfico representativo do efeito do extrato Hexânico na expressão do gene <i>NF- κB</i>	47
Figura 11 - Gráfico representativo do efeito do extrato Hexânico na expressão do gene <i>p38α</i>	48
Figura 12 - Possível mecanismo utilizado por células Caco-2 para proliferação celular.....	57
Figura 13 - Curva padrão para o gene <i>ACTB</i>	86
Figura 14 - Curva de <i>melting</i> para o gene <i>ACTB</i>	86
Figura 15 - Curva padrão para o gene <i>TNF-α</i>	87
Figura 16 - Curva de <i>melting</i> para o gene <i>TNF-α</i>	87
Figura 17 - Curva padrão para o gene <i>p38α</i>	88
Figura 18 - Curva de <i>melting</i> para o gene <i>p38α</i>	88
Figura 19 - Curva padrão para o gene <i>NF- κB</i>	89
Figura 20 - Curva de <i>melting</i> para o gene <i>NF- κB</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos dos genes de interesse.....	39
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Tema.....	16
1.2 Delimitação do tema.....	16
1.3 Problema	16
1.4 Hipótese	16
1.5 Objetivos	17
1.5.1 Objetivo Geral	17
1.5.2 Objetivos Específicos	17
1.6 Justificativa.....	17
 2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	 21
2.1 Inflamação e câncer...	21
2.2 NF- κ B.....	23
2.3 TNF- α	24
2.4 p38 α	26
2.5 Família Myrtaceae	29
2.5.1 <i>Calypttranthes grandifolia</i> O. Berg	30
 3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	 32
3.1 Tipo de pesquisa	32

3.2 Ambiente de pesquisa.....	32
3.3 Extratos vegetais.....	32
3.3.1 Extrato hexânico.....	33
3.3.2 Extrato etanólico.....	33
3.3.3 Diluição dos extratos	34
3.4 Avaliação da Viabilidade celular por Alamar Blue	34
3.5 Viabilidade celular por Azul de Trypan	34
3.6 Cultura de células.....	35
3.7 Extração de RNA.....	35
3.7.1 Quantificação de RNA.....	36
3.8 Síntese do DNA complementar (DNAC)	36
3.9 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real.....	37
3.9.1 Análise da Expressão Gênica	38
3.10 Metodologia de análise dos dados	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Avaliação da Viabilidade Celular por Alamar Blue	41
4.2 Análise da Expressão Gênica	42
4.2.1 Avaliação do efeito do extrato etanólico de <i>Calypttranthes grandifolia</i> O.Berg na expressão de <i>TNF-α</i> , <i>NF-κB</i> e <i>p38α</i>	44
4.2.2 Avaliação do efeito do extrato Hexânico de <i>Calypttranthes grandifolia</i> O. Berg. na expressão de <i>TNF-α</i> , <i>NF-κB</i> e <i>p38α</i>	46
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES	85

1 INTRODUÇÃO

O câncer resulta de um crescimento descontrolado de uma população de células de um determinado tecido. O seu desenvolvimento requer pontos fundamentais como proliferação autossuficiente, insensibilidade a sinais anti-proliferativos, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, manutenção e aumento da vascularização. Ainda, em casos de malignidade, temos a invasão tecidual e metástase (HANAHAHAN et al., 2000).

A associação entre o câncer e a inflamação é amplamente descrita (BALKWILL et al., 2001; COUSSENS et al., 2002). Em meados do século XIX foi descrito que o câncer tinha origem em locais com inflamação crônica a partir de agentes que causariam dano tecidual e aumento da proliferação celular. Atualmente sabe-se que a proliferação celular, apenas, não tem ação carcinogênica, porém, a manutenção da proliferação celular em um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativo e agentes indutores de dano no DNA estão relacionados ao desenvolvimento da patologia. Ainda, a expressão de alguns genes frequentemente é relacionada de forma negativa com o estágio do câncer e seu prognóstico (BALKWILL et al., 2001; CHANG et al., 2004; WANG et al., 2006; GALON et al., 2006).

A resposta inflamatória organiza as defesas do organismo e medeia a reparação dos tecidos e sua regeneração. Este processo pode ocorrer devido a um dano tecidual causado por ação infecciosa ou não. Estudos epidemiológicos apontam que há uma conexão entre a inflamação e uma predisposição para o desenvolvimento de câncer sendo que inflamações de longo prazo podem levar ao desenvolvimento de displasia (KUPER et al., 2000). Condições associadas à irritação crônica e posterior inflamação apresentam maior predisposição ao câncer, como exposição em longo prazo ao cigarro, amianto e sílica (BALKWILL et al., 2001; COUSSENS et al., 2002).

Mesmo em tumores em que a relação causal da inflamação não tenha sido estabelecida, estes são caracterizados por apresentar uma inflamação latente. As células inflamatórias e seus mediadores estão presentes em tumores e estudos sugerem que oncogenes de diferentes classes moleculares conduzem a produção de mediadores inflamatórios (BALKWILL et al., 2001). A combinação de anti-inflamatórios com a quimioterapia tradicional pode ser eficiente na inibição do crescimento tumoral e melhorar a sobrevida do paciente. Porém, é importante avaliar a relação entre a via antitumoral e pró-tumoral da via inflamatória (ZHU et al., 2012).

O processo inflamatório envolve a expressão de diversas proteínas inflamatórias como citocinas, quimiocinas, enzimas que catalisam mediadores inflamatórios, receptores para mediadores inflamatórios e moléculas de adesão. Muitas destas estão presentes em células normais, porém, em doenças inflamatórias, por exemplo, sua produção é aumentada. Variações na expressão desses genes são reguladas por fatores de transcrição, e o seu excesso de ativação pode estar relacionado com a prolongação da liberação de citocinas inflamatórias (BARNES, 1994). A inativação do *NF- κ B*, família de fatores transcricionais para indução da inflamação, mostra uma diminuição na frequência de tumores visíveis (GRETEN et al., 2004).

A *p38* MAPK é um elemento chave na produção de mediadores inflamatórios, incluindo o *TNF- α* . Sua via de sinalização desempenha um papel importante na regulação de processos celulares, principalmente a inflamação (YANG et al., 2012; BYEON et al., 2011; GARCIA et al., 1998). Uma alta expressão de *p38* ativo é demonstrada em doenças inflamatórias, como gastrite, colite, artrite e hepatite (YANG et al., 2013; YU et al., 2012). As subunidades *p38 α* e *p38 δ* estão altamente expressas em macrófagos, enquanto a subunidade *p38 β* não é detectada (YANG et al., 2014).

Diversos estudos demonstram o efeito do uso de plantas medicinais que podem ser utilizados para diversas patologias, incluindo o câncer (RASUL et al., 2012; RASUL et al., 2011; LEE et al., 2010; JANG, 2010). Todavia, são necessários estudos *in vitro* e *in vivo* para melhor compreensão de suas propriedades e efeitos em vias de sinalização específicas.

O Brasil apresenta a maior diversidade de espécies de plantas do mundo. Porém, menos de 10% passaram por estudos a fim de avaliar suas características biológicas e menos de 5% passaram por estudos fitoquímicos detalhados. Assim, há pouco conhecimento sobre seu potencial citotóxico em linhagens celulares tumorais (FERREIRA et al., 2011).

A família Myrtaceae tem grande importância nas florestas tropicais. Vários membros da família são utilizados na medicina popular e estudos já demonstraram diversos efeitos biológicos da planta (STEFANELLO, 2011; DI STASI et al., 2002; PASCOAL et al., 2014; MICHEL et al., 2013). Esta família apresenta metabólitos secundários importantes como taninos, flavonoides, óleos essenciais e ácidos triterpenoides (JORGE et al., 2000). Estes compostos podem ser encontrados de acordo com o extrato produzido. Extrato etanólico é denominado polar e o hexânico, apolar. Assim, essas características permitem que diferentes compostos sejam extraídos.

1.1 Tema

Expressão de genes relacionados a alterações precursoras de neoplasias tratadas com extratos de *Calypttranthes grandifolia* O. Berg.

1.2 Delimitação do tema

Análise da expressão de genes relacionados a alterações precursoras de neoplasias em células de adenocarcinoma colorretal da linhagem Caco-2 tratados com extratos etanólico e hexânico de *Calypttranthes grandifolia*.

1.3 Problema

Através deste estudo, pretende-se responder as seguintes questões:

- Há variação na expressão de genes relacionados a alterações precursoras de neoplasias em células de adenocarcinoma colorretal da linhagem Caco-2 tratados com extratos vegetais de *Calypttranthes grandifolia*?
- Há diferença na expressão dos genes em estudo conforme o tipo de extrato utilizado (etanólico e o hexânico)?

1.4 Hipótese

A hipótese a ser testada pelo presente estudo é:

- O extrato de *Calypttranthes grandifolia* pode alterar a expressão de *TNF- α* , *NF- κ B* e *p38 α* em células de adenocarcinoma colorretal da linhagem Caco-2, podendo estar associado ao possível potencial anti-inflamatório e antitumoral da planta.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Investigar a expressão de genes associados à proliferação e inflamação em células de linhagem Caco-2 tratadas com extratos obtidos de *Calypttranthes grandifolia*.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão dos genes *NF-κB*, *TNF-α* e *p38α* em células da linhagem Caco-2 tratadas com extrato etanólico *Calypttranthes grandifolia*.
- Avaliar a expressão dos genes *NF-κB*, *TNF-α* e *p38α* em células da linhagem Caco-2 tratadas com extrato hexânico de *Calypttranthes grandifolia*.

1.6 Justificativa

A inflamação associada ao câncer é um alvo atraente de futuras terapias antitumorais. Estudos populacionais demonstraram que a utilização prolongada de ácido acetilsalicílico ou outras drogas anti-inflamatórias não esteroidais retardam o desenvolvimento de adenomas pré-malignos e também pode reduzir a incidência de diferentes formas de neoplasia (BERTAGNOLLI et al, 2006; KOEHNE et al., 2004; FLOSSMANN et al., 2007; CHAN et al., 2007; WEBER et al., 2007).

As citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento podem desempenhar o papel chave na interação entre as células tumorais, vaso sanguíneo e leucócitos infiltrantes. A presença de componentes inflamatórios no microambiente da maioria dos tecidos neoplásicos frequentemente resulta numa maior angiogênese, resistência a hormônios (quando tumores hormônio dependentes) e inibição da imunidade adaptativa antitumoral. A sobrevivência,

proliferação e, eventualmente, invasão e metástase das células tumorais são reguladas por mediadores inflamatórios presentes no local do tumor (GERMANO et al., 2008).

Citocinas inflamatórias primárias como a Interleucina 1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) expressas pela infiltração de leucócitos e células tumorais, são alvos para a terapia anticâncer. Estratégias anticitocinas contra tumores são estudadas a partir de inibidores de TNF em algumas doenças inflamatórias (BARTLETT et al., 1997). Ensaios clínicos com antagonistas de *TNF- α* combinado ou não com outras terapias foram realizados em pacientes com câncer. Nos casos de câncer sólido avançado, o antagonista de *TNF- α* foi bem tolerado e evidenciou a atividade biológica e resposta parcial de carcinoma renal ou estabilização da doença (MADHUSUDAN et al., 2005; HARRISON et al., 2007).

A permanente ativação do *NF- κ B* contribui de forma ativa na tumorigênese, através da promoção da progressão do ciclo celular e inibição da apoptose. Sua ativação pode ocorrer através do *TNF- α* , assim, a inibição deste fator poderia auxiliar em terapias de câncer que visem a apoptose. (GARG et al., 2002; BEG et al., 1996). A inibição do *NF- κ B* está ligada à apoptose e retardo no crescimento celular, podendo contribuir no tratamento de câncer (STROH et al., 2003).

A MAPK *p38* pode ter atividade supressora de tumor, através da regulação do gene p53, por exemplo, interferindo na progressão do ciclo celular e induzindo a apoptose. Porém, pode apresentar também uma atividade oncogênica, pois pode estar relacionada com processos como a invasão, inflamação e angiogênese, os quais são fundamentais no desenvolvimento de um tumor (DOLADO et al., 2008).

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é um hábito tão antigo quanto a humanidade. As plantas constituem uma grande

fonte de substâncias ativas que podem ser usadas na medicina terapêutica pois seus metabólitos apresentam uma grande diversidade estrutural (BRANDÃO, 2010). Diversos anti-inflamatórios de produtos naturais foram extraídos de frutas, vegetais, especiarias e ervas medicinais tradicionais e estes vem ganhando importância como quimiopreventivo do câncer e como agentes terapêuticos (ARAVINDARAM et al., 2010).

Estudos demonstram que diferentes extratos podem influenciar na expressão de *TNF- α* , *NF- κ B* e *p38*. Estudo realizado com extrato de *Prunella vulgaris* (Lamiaceae) demonstrou que houve redução da ativação de *NF- κ B*, supressão da fosforilação de *p38* e ERK induzido por *TNF- α* e não houve produção de *TNF- α* , inibindo a adesão de monócitos/macrófagos THP-1 em células do músculo liso aórtico (PARK et al., 2013). Outro estudo utilizando extrato de *Picea mariana* (Pinaceae), demonstrou inibição da liberação de VEGF induzida por *TNF- α* em queratinócitos psoriáticos e normais. Foi observada a inibição da fosforilação e degradação de *I κ B α* induzido por *TNF- α* e inibição da fosforilação de *NF- κ B p65* (GARCÍA-PÉREZ et al., 2014).

Nas últimas duas décadas, os produtos fitoterápicos alcançaram um papel de grande importância na descoberta de novas drogas para o câncer (BHANOT et al., 2011). Drogas derivadas de produtos naturais com atividade antibacteriana, anticoagulante, antiparasitária, imunossupressora e anticancerígena são capazes de tratar 87% das doenças humanas categorizadas (NEWMAN et al., 2000). Entre os 128 fármacos anticancerígenos liberados no mercado entre os anos de 1981 e 2010, 12 eram produtos naturais e 32 derivados destes, provenientes de diversas fontes como plantas e microrganismos. O total de pequenas moléculas para tratamento de câncer liberadas desde 1940 até 2010 é de 175, sendo que 131 moléculas são inspiradas em produtos naturais (NEWMAN et al., 2012).

Alguns quimioterápicos lançados no mercado originados de produtos naturais são: vimblastina (Velban[®]) e vincristina (Oncovin[®]) ambas extraídas de

Catharrantus roseus (MAGNOTTA et al., 2006). Outros fármacos como etoposídeo (Vepeside®), teniposídeo (Vumon®) e taxol (Paclitaxel; Taxol®), foram lançados para utilização na terapia para o câncer nas últimas décadas (WANG, 1998a), os quais fortaleceram a busca da indústria farmacêutica por moléculas de interesse terapêutico em produtos naturais (VIEGAS et al., 2006).

O estudo de novas plantas com potencial anti-inflamatório, anti-tumoral e anti-carcinogênico apresenta grande importância biotecnológica, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer. Diversos membros da família Myrtaceae já foram estudados e apresentaram diferentes atividades, como antidiarreico, antimicrobiano, antioxidante, antitumoral, antirreumático, anti-inflamatório e ainda, como redutor de colesterol circulante (STEFANELLO, 2011; DI STASI et al., 2002). Ainda não existem estudos sobre a atividade da *Calyptranthes grandifolia*, tornando-se um estudo de grande importância devido ao potencial que a família Myrtaceae pode apresentar para o tratamento de processos inflamatórios e tumorais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Inflamação e câncer

A carcinogênese é um processo dinâmico, multifatorial, e de longo prazo que envolve vários fatores complexos e vias de sinalização. A fase de iniciação do câncer é seguida de uma fase de progressão, culminando, em alguns casos, em metástase que conduz a uma disseminação descontrolada do câncer pelo corpo. Porém, apesar de as fases de iniciação e promoção do câncer serem importantes, evidências sugerem que a inflamação é um componente crítico na progressão tumoral. Muitos cânceres surgem a partir de locais com infecção, irritação crônica e inflamação. Além disso, o microambiente do tumor é, em grande parte, orquestrado por células inflamatórias (macrófagos), sendo um participante indispensável no processo neoplásico, auxiliando na proliferação, sobrevivência celular e migração (FEARON et al., 1990; HANAHAN et al., 2000; PAN, et al., 2008).

Diversos produtos de genes pró-inflamatórios foram identificados, atuando em conjunto para mediar um papel crítico na supressão de apoptose, proliferação, angiogênese, invasão e metástase de tumores. Entre os produtos de genes estão o fator de necrose tumoral alfa (*TNF- α*); outros membros da família das interleucinas, como *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-18*; quimiocinas, como *Mip-3 α* , *CXCL12*; fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*),

ciclooxigenase-2 (COX-2), e 5-lipoxigenase (5-LOX). A expressão destes genes é regulada principalmente pelo fator de transcrição *NF- κ B* que é constitutivamente ativo na maioria dos tumores e é prontamente induzida por vários agentes carcinogênicos químicos, promotores de tumor, proteínas virais carcinogênicas, agentes quimioterápicos e radiação gama (SURH, 2003; AGGARWAL et al., 2006).

A MAPK *p38* é uma proteína que também pode apresentar envolvimento no desenvolvimento de tumor. Além disso, pode regular positivamente o *NF- κ B*, que está relacionado com a proliferação e sobrevivência celular e, por sua vez, pode regular positivamente o *TNF- α* (Figura 1).

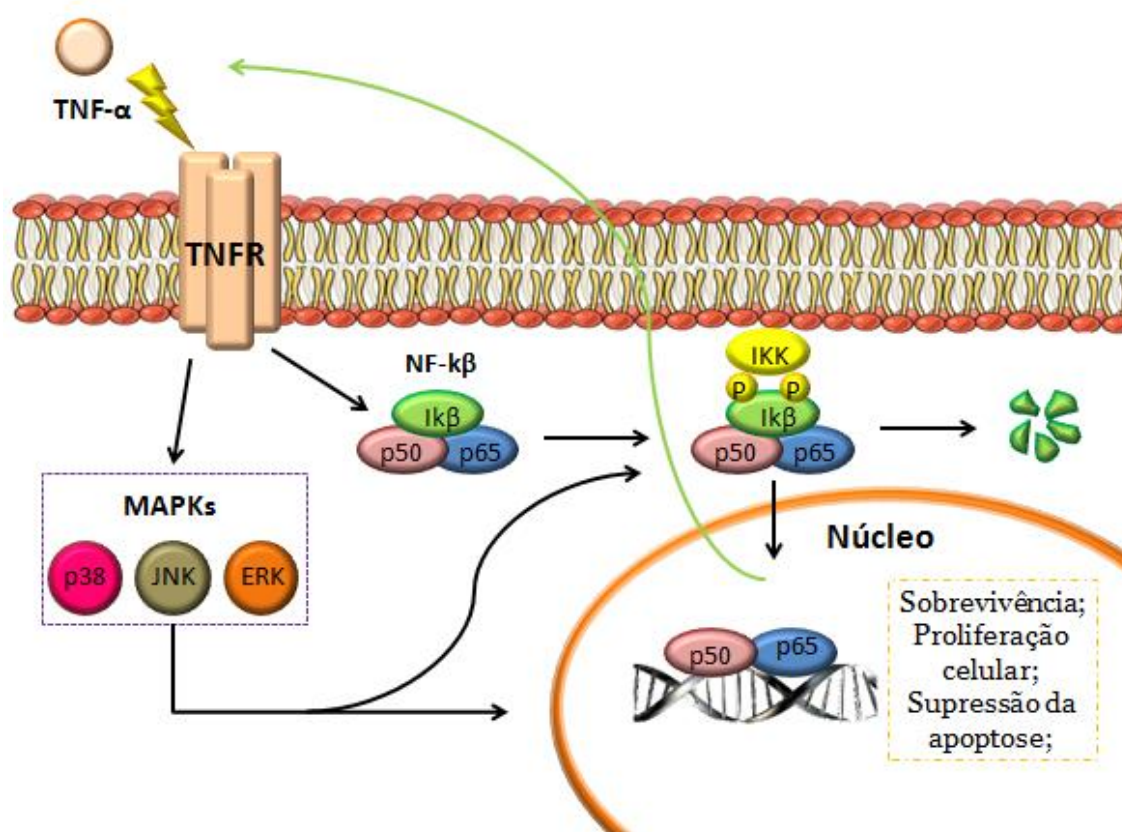


FIGURA 1. Representação das vias de sinalização do TNF- α , NF- κ B e p38 α . Adaptado de Kim et al. 2013.

2.2 *NF- κ B*

O gene *NF- κ B* é um fator de transcrição descoberto em 1986 como um fator nuclear regulador da expressão gênica de imunoglobulinas em células B ativadas (SEN et al., 1986). Este gene é expresso em quase todos os tipos celulares (MAY et al., 1998) e está envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta imuno-inflamatória (HOFFMANN et al., 2006). O *NF- κ B* é um heterodímero formado por duas subunidades: uma proteína de 50kDa denominada p50 ou *NF- κ B-1* e outra proteína de 65kDa denominada de p65 ou RelA (BAEUERLE et al., 1988). O gene da subunidade *NF- κ B-1* está localizado no braço longo do cromossomo 4 na posição 24 (4q24) (OMIM, 2014).

NF- κ B-1 e *NF- κ B-2* são denominados p50 e p65, formando um complexo *NF- κ B*. Este complexo é inibido por proteínas I-kappa-B que inativam o *NF- κ B*. Estas proteínas associam-se a dímeros de *NF- κ B*, formando trímeros (p50/p65/IkB). Esta conformação impede que o *NF- κ B* se ligue ao DNA dentro do núcleo, retendo este complexo no citoplasma da célula. A ativação do *NF- κ B* pode ocorrer por diferentes estímulos extracelulares, como citocinas pró-inflamatórias (*TNF- α* e a IL-1), fatores ativadores de linfócitos T e B, LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano, proteínas virais, fatores de crescimento e fatores indutores de estresse. Para tanto, deve ocorrer a fosforilação dos resíduos de serina na proteína IkB através de quinases, marcando-a para destruição via ubiquitinação. Isto permite a ativação do complexo *NF- κ B* e sua translocação para o núcleo (MCKAY et al., 1999).

O *NF- κ B* é um regulador chave de diversas citocinas inflamatórias (LI & VERMA, 2002). Após a estimulação por *TNF- α* , o complexo IkB (IKK) torna-se ativo, levando a translocação do *NF- κ B* para o núcleo (KARIN, 2006). Dentre os genes controlados pelo *NF- κ B* estão o fator de crescimento GM-CSF (fator

estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos), moléculas de adesão celular, *MAd-CAM-1* (*mucosal addressin cellular adhesion molecule-1*), *ELAM-1* (*endothelium leukocyte adhesion molecule 1*), *ICAM-1* (molécula de adesão intercelular 1), *VCAM* (molécula de adesão da célula vascular 1); citocinas *IL-1*, *2*, *6*, *8*, *TNF- α* , *INF- α* e β , anti-apoptóticos, TRAF-1 e TRAF-2 (fatores associados ao receptor de TNF 1 e 2, respectivamente), c-IAP 1 e c-IAP2, (proteínas inibidoras da apoptose 1 e 2, respectivamente), entre outros (BAEUERLE et al., 1988).

Além da função chave no sistema imunitário, o *NF- κ B* desempenha um papel importante no crescimento celular, diferenciação, regulação do ciclo celular e apoptose. Por isso, disfunções no sistema de controle da atividade do *NF- κ B* estão ligadas a condições patológicas como inflamação crônica, transformação neoplásica, artrite autoimune, asma, choque séptico, fibrose pulmonar, glomerulonefrite e aterosclerose (ARADHYA et al., 2001; CHEN et al., 1999). Diversos linfomas malignos, câncer de mama, cólon, fígado, bexiga, próstata e pulmão estão associados com alta ativação de *NF- κ B* (RAYET et al., 1999).

2.3 *TNF- α*

O fator de necrose tumoral alfa (*TNF- α*) é uma citocina pró-inflamatória multifuncional envolvida com apoptose, sobrevivência celular, inflamação e imunidade (BAZZONI et al., 1996; LOCKSLEY et al., 2001). Foi isolado em 1975 e demonstrou indução de necrose hemorrágica de tumores de ratos (CARSWELL et al., 1975; OLD, 1985). *TNF- α* é uma proteína de 17-kDa consistindo de 157 aminoácidos formando um homotrímero (MULLER et al., 1987). Sua bioatividade é principalmente regulada por receptores de ligação ao *TNF- α* . Ele é produzido principalmente por macrófagos, linfócitos T e células *Natural Killer* (NK). Nas células, é sintetizado como uma proteína de membrana de 26kDa (pro-TNF), que é ligado à membrana e é liberado através da

clivagem do seu pro-domínio através da enzima conversora de TNF, denominada TACE. Assim, é liberada uma molécula solúvel que pode se ligar aos receptores TNFR1 e TNFR2 (Receptor de *TNF- α* associado ao fator 1 e 2, respectivamente) (BEMELMANS et al., 1996; SKOOG et al., 1999). O gene *TNF- α* está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.33) (OMIM, 2014).

O *TNF- α* atua através de dois receptores diferentes (VANDENABEELE et al., 1995). A sua afinidade para o TNFR-2 é cinco vezes maior que para o TNFR-1 (TARTAGLIA et al., 1992) e este último inicia a maioria das atividades biológicas de *TNF- α* . O TNFR-1 (p60) é expresso em todos os tipos de células, enquanto o TNFR-2 (p80) é limitado principalmente para as células do sistema imunológico (AGGARWAL, 2003). A maior diferença entre estes receptores é que em TNFR-1 existe um domínio de morte, que é ausente em TNFR-2. Assim, o receptor 1 se torna um membro importante da família de receptores de morte que compartilha a capacidade de induzir a morte celular por apoptose (ASHKENAZI et al., 1998).

Além da apoptose, o TNFR-1 tem capacidade de induzir sinais de sobrevivência celular (BAKER et al., 1998). TNFR associado ao domínio de morte (TRADD) se liga ao domínio de morte de TNFR-1 e recruta proteínas adaptadoras de receptor de interação proteica (RIP), fator 2 associado ao TNFR (TRAF-2) e domínio de morte associado ao Fas (FADD) (RATH et al., 1999).

As proteínas adaptadoras recrutam moléculas chaves que são responsáveis por sinalização intracelular. Quando TNFR-1 sinaliza apoptose, FADD se liga a pró-caspase 8, que é ativada e inicia uma cascata de proteases levando à apoptose (DEGTEREV et al., 2003). O último evento na sinalização para apoptose é a ativação de endonucleases, como a Endonuclease G, resultando na fragmentação do DNA. Porém, quando o TNFR-1 sinaliza sobrevivência, TRAF-2 é recrutado para o complexo, inibindo a apoptose

através do inibidor da proteína citoplasmática de apoptose (cIAP). A ligação do TRAF-2 inicia a via de fosforilação resultando na ativação de fatores de transcrição cFos/cJun via proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK) e quinase cJun N-terminal (JNK) (NATOLI et al., 1997). O principal evento de sinalização de TRAF-2 e do receptor de interação proteica (RIP) é a ativação do fator de transcrição *NF- κ B* através de quinase indutora de *NF- κ B* (NIK) e o inibidor de complexo $\kappa\beta$ (IKK) (DEVIN et al., 2000).

Os fatores de transcrição *NF- κ B* e cFos/cJun induzem a transcrição de genes antiapoptóticos, proliferativos, imunomoduladores e inflamatórios. *NF- κ B* é o principal fator de sobrevivência na prevenção de apoptose induzida por *TNF- α* e a inibição deste fator de transcrição pode melhorar a eficácia de terapias de câncer indutoras de apoptose (BEG et al., 1996). A ativação do *NF- κ B* em muitos tumores malignos é elevada e constitutiva, e seu papel na regulação do equilíbrio da apoptose em células de proliferação de tumor indica o seu papel na oncogênese (DOLCET et al., 2005; LIN et al., 2003).

A promoção de tumor mediada por *TNF- α* pode envolver diferentes vias com efeito direto sobre as células tumorais de baixa concentração desta citocina. Pode ocorrer interação com o sistema de quimiocinas com a indução do receptor de quimiocina CXC 4 (CXCR4), podendo induzir sinais de sobrevivência e proliferação celular e também pode ocorrer a estimulação de transição epitelial para mesenquimal (BATES et al., 2003; KULBE et al., 2007; KULBE et al., 2005).

2.4 p38 MAPK

A p38 é uma proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e é conhecida por ser ativada pelo stress. Esta proteína é ativada por dupla fosforilação (SHE et al., 2002). Proteínas quinases ativadas por mitógeno são componentes de sinalização, que são importantes na conversão de estímulos

extracelulares em uma ampla variedade de respostas celulares (SEBOLT-LEOPOLD et al., 2004).

JNK e *p38* MAPK são ativadas pelo stress ambiental e genotóxico e tem um papel chave na inflamação, homeostasia dos tecidos como controle da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e migração de tipos celulares específicos (NEBREDÁ et al., 2000; KYRIAKIS, et al., 2001; KARIN et al., 2005; WESTON et al., 2007; RINCON et al., 2009). As funções das MAPK JNK e *p38* no desenvolvimento do câncer são complexas, pois modulam uma variedade de respostas celulares (WAGNER et al., 2009).

Existem quatro genes que codificam a MAPK *p38*: MAPK14, que codifica a *p38α*, MAPK11, que codifica *p38β*, MAPK12, que codifica a *p38γ* e MAPK13 que codifica *p38δ*. A isoforma *p38α* é a mais abundante na maioria dos tipos celulares (ONO et al., 2000; CUENDA et al., 2007). A ativação de *p38* pode se dar pela sua fosforilação através das MAP kinase kinases como MKK3 e MKK6 e, por vezes, MKK4. A autofosforilação também pode contribuir para a ativação de MAPK *p38* (CUENDA et al., 2007; MITTELSTADT et al., 2005). O gene relacionado à isoforma *p38α* localiza-se no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31) (OMIM, 2014).

Os dois grupos de proteínas reguladas por fosforilação mediada por *p38* MAPK são fatores de transcrição, como *p53*, e proteínas quinases (ONO et al., 2000; CUENDA et al., 2007). Existem evidências que *p38α* pode apresentar um papel de supressor de tumor, função mediada pela regulação negativa da progressão do ciclo celular e indução da apoptose, apesar da indução de diferenciação terminal também contribuir para a função supressora tumoral (BULAVIN et al., 2004; DOLADO et al., 2008; HUI et al., 2007). No entanto, *p38α* também pode apresentar função oncogênica, mediada pelo seu envolvimento com processos chave de progressão do câncer, como invasão, inflamação e angiogênese. A expressão ou atividade das MAPK JNK e *p38* e componentes de sua via são frequentemente alterados em tumores humanos e

linhagens celulares de câncer. Tendo em vista as diversas funções relacionadas a tumorigênese que as quinases podem controlar, é importante considerar o tipo de tumor antes de tentativas de modulação destas vias para a terapia de câncer (WAGNER et al., 2009).

A via de *p38* MAPK pode regular positivamente a atividade de *NF-κB* por diferentes mecanismos, incluindo a remodelação da cromatina, através de fosforilação da serina 10 na histona H3 no promotor dependente de *NF-κB*, como IL-8 e MCP-1 (SACCANI et al., 2002) ou por interferir na IKK ou a subunidade p65 de forma direta ou indireta (VERMEULEN et al., 2003; KEFALOYIANNI, 2006). Um estudo demonstrou que a fosfatase *Wip1* desfosforila diretamente a p65 modulando negativamente a transcrição de genes *NF-κB* dependente, como o *TNF-α*. *Wip1* também pode desfosforilar *p38 α* e assim, interferir indiretamente com efeito positivo da via de sinalização MAPK *p38* na sinalização de *NF-κB* (CHEW et al., 2009).

A atividade supressora de tumor da *p38* MAPK pode ser atribuída aos efeitos inibitórios das isoformas *p38 α* e *p38 β* nos pontos de controle do ciclo celular G0, G1/S e G2/M (AMBROSINO et al., 2001), promover a parada de crescimento e indução da apoptose (BULAVIN et al., 2004; KUMMER et al., 1997; SHE et al., 2001) ou senescência celular (WANG et al., 2002; HAQ et al., 2002; BULAVIN et al., 2002). Isto sugere que a inativação da via de *p38* MAPK aumenta a transformação celular através da regulação negativa da sobrevivência celular e proliferação (BULAVIN et al., 2004; BRANCHO et al., 2003; TIMOFEEV et al., 2005). Por demonstrar função supressora de tumor, a ativação de *p38* MAPK poderia suprimir o desenvolvimento do fenótipo maligno. A expressão forçada de *p38* MAPK ativo em células de rabdomiossarcoma inibiu a proliferação e induziu a diferenciação terminal (PURI et al., 2000).

2.5 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae tem grande importância nas florestas tropicais, frequentemente produzem frutos comestíveis e apresenta representantes importantes e de grande interesse na medicina. Esta família compreende 4.620 espécies distribuídas em 140 gêneros com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais como Austrália e América Central e do Sul (MABBERLY, 1997). Os principais gêneros são *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Eugenia*, *Pseuocaryophyllus*, *Syzygium*, *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Plinia* e *Malaleuca*, e vários membros da família são utilizadas na medicina popular como antidiarreico, antimicrobiano, antioxidante, antitumoral, antirreumático, anti-inflamatório e ainda, como redutor de colesterol circulante (STEFANELLO, 2011; DI STASI et al., 2002).

Em um estudo realizado recentemente com folhas de *Campomanesia adamantium* da família Myrtaceae demonstrou que houve atividade antiproliferativa na linha de células PC-3 e induziu apoptose e regulou negativamente o gene *NF- κ B* (PASCOAL et al., 2014). A planta *Syzygium campanulatum* (Myrtaceae) demonstrou inibição significativa do crescimento do tumor devido à inibição da angiogênese e da indução da morte celular (AISHA et al. 2013).

Eugenia uniflora L., da família Myrtaceae, popularmente denominada como pitangueira é muito apreciada no Brasil por seus frutos. O chá obtido de suas folhas é utilizado na medicina popular contra febre, doenças do estômago, hipotensão, hipoglicemiante e gota (LORENZI et al., 2002; AURICCHIO et al., 2003). A *Plinia trunciflora* O. Berg (Myrtaceae), também conhecida como jabuticabeira é apreciada no Brasil por seus frutos. Seu extrato mostrou atividade antioxidante e antimicrobiana (SOUZA-MOREIRA et al., 2010). Espécies de *Plinia* são utilizadas na medicina popular no tratamento de distúrbios de estômago, garganta e diabetes (BRAGANÇA, 1996).

Estudo realizado por Lago et al. (2011) revelou que o óleo essencial de *E. uniflora* apresentou atividade contra cepas de diversas leveduras, como *C. gattii* e *C. neoformans* enquanto o óleo essencial de *P. trunciflora* demonstra atividade contra *C. dubliniensis* e *C. albicans*. Indicando assim que os óleos essenciais das duas espécies de Myrtaceae podem ser explorados como agentes antibacterianos e fungicidas. Diversos estudos que investigaram o potencial biológico de plantas da família Myrtaceae já demonstraram atividade anti-inflamatória (MICHEL et al., 2013; JEONG et al., 2013; FLORES et al., 2013; SERAFINO et al., 2008; SANTOS et al., 1997b; SHARMA et al., 2013) e antitumoral (ZHANG et al., 2013; RIZZO et al., 2014; SULTANA et al., 2014; LIU et al., 2014; YE et al., 2007).

2.5.1 *Calyptranthes grandifolia* O.Berg.

A planta *Calyptranthes grandifolia* pertence à família Myrtaceae, conhecida popularmente como Guamirim. É nativa do Rio Grande do Sul e é comum na floresta atlântica e esporádica na floresta com araucária (SOBRAL et al., 2006). O gênero *Calyptranthes* apresenta cerca de 100 espécies distribuídas na América tropical, entre México e o Uruguai. No Rio Grande do Sul podem ser encontradas seis espécies *C. concinna* DC, *C. grandifolia* O. Berg, *C. lucida* Martius ex DC, *C. pileata* D. Legrand, *C. rubella* O. Berg D. Legrand e *C. triconia* D. Legrand (LIMBERGER et al., 2002).

Ainda não existem estudos relacionando possíveis efeitos biológicos da espécie *Calyptranthes grandifolia*. Porém, já foram demonstradas atividades importantes do gênero *Calyptranthes*. O benzopireno ou cromeno, é um importante componente estrutural presente em compostos naturais e apresenta uma atividade biológica importante (REN, et al., 2011). Alguns de seus derivados apresentam atividade antitumoral, antivascular, antimicrobiana, antioxidante, inibidora de *TNF- α* , antifúngica, entre outras. Um exemplo destes compostos como 2-metil-5,7-dimetóxi-2H-cromeno e 2,8-dimetil-5,7-dimetóxi-

2H-cromeno foram isolados do óleo essencial de *Calypttranthes tricona* o qual apresentou atividade antifúngica (HENRIETTE, et al., 2004; CHETAN, et al,2012; MILAN, et al., 2011; CHENG, et al., 2003; SURESH,et al., 2010).

A espécie *Calypttranthes spruceana* Berg., Myrtaceae, também denominada laranjinha, apresentou dois componentes importantes. Um rico em limoneno (perilaldeído) e outro dominado por α e β -pineno. As folhas desta plantas são utilizadas em chá por comunidades ribeirinhas para fins terapêuticos, contra males do estômago (CORREA, et al., 1972; SILVA, et al., 1984, MAIA, et al., 2001).

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Tipo de Pesquisa

A pesquisa é classificada como transversal experimental e de caráter quantitativo.

3.2 Ambiente de Pesquisa

Células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2), ATCC: HTB-37, foram cultivadas no Laboratório de Cultura de Células do Centro Universitário UNIVATES e após foram realizados os procedimentos para estudo da expressão gênica no laboratório de Biologia Molecular da mesma instituição.

3.3 Extratos vegetais

O material botânico (folhas) da *Calypttranthes grandifolia* O.Berg. foi coletado no município de Lajeado (RS) e identificado pela Botânica Prof. Dra. Elisete Maria de Freitas.

Os extratos hexânico e etanólico a serem utilizados para este estudo foram fornecidos pelo projeto de pesquisa intitulado “Efeito anti-inflamatório, anti-carcinogênico e toxicidade de extratos vegetais em cultura de células”,

coordenado pela Prof. Dra. Márcia Goetttert, e foram preparados conforme a metodologia descrita abaixo.

3.3.1 Extrato hexânico

As folhas do espécime vegetal foram desidratadas, em estufa com ar circulante, a 38 °C por 24 horas. Posteriormente, foram reduzidas a fragmentos de pequena dimensão para aumentar a superfície de contato do vegetal com a solução extratora. As folhas da *Calypttranthes grandifolia* O.Berg. foram acondicionadas com o solvente hexânico em um frasco âmbar em temperatura ambiente durante o período de 72 horas. Após, passaram por filtração a vácuo e o filtrado armazenado em frasco âmbar, mantido em temperatura ambiente até o momento da remoção do solvente. A maceração estática do espécime vegetal teve duração de duas semanas com duas trocas do solvente. Em seguida, foi realizada a filtração a vácuo e a remoção do solvente com o auxílio de um evaporador rotativo a 40 °C. Ao final, o extrato obtido foi armazenado em frascos âmbar devidamente identificados e mantidos sob refrigeração ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) até o momento da realização dos ensaios.

3.3.2 Extrato etanólico

As folhas de *Calypttranthes grandifolia* O.Berg. foram desidratadas, em estufa com ar circulante, a 38 °C por 24 horas. Após este período, foi realizada a maceração estática (à frio) dos fragmentos das folhas com álcool etílico 90%, sendo estes acondicionados em um frasco âmbar e mantidos em temperatura ambiente durante 7 dias. Decorrido o período de extração, foi realizada a filtração a vácuo e a remoção do solvente com o auxílio de um evaporador rotativo a 40 °C. O extrato obtido foi envasado em frasco âmbar devidamente rotulado e mantido sob refrigeração ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) até o momento dos ensaios.

3.3.3 Diluição dos extratos

A solubilização do extrato foi realizada com dimetilsulfóxido (DMSO) de modo que a concentração final não fosse maior do que 0,5%.

3.4 Avaliação da Viabilidade Celular por Alamar Blue

Para avaliar a proliferação celular, as células Caco-2 foram plaqueadas em densidade de 1×10^5 células/mL em placas de 96 poços, contendo 200 μ L de meio DMEM *Low glucose*, a 10% de SBF, sendo incubadas durante 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂, 90% de umidade e temperatura de 37°C. Posteriormente, as células foram tratadas com concentrações de 200, 100, 50, 25 μ g/mL por poço, do extrato em análise, sendo novamente incubadas por 72 horas. Após este período, o tratamento foi removido e adicionado uma solução de 10% de corante azul de Alamar por poço. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 6 horas de incubação, em comprimento de onda de 540 nm (estado oxidado) e 620 nm (estado reduzido) em leitor de ELISA. As células apenas em meio de cultura e DMSO foram utilizadas como controle negativo. O percentual de redução do Alamar Blue, ou seja, o percentual de viabilidade celular, foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\% \text{Redução Alamar Blue} = \text{Abs } 540\text{nm} - (\text{Abs } 630\text{nm} \times \text{FC}^*) \times 100$$

Onde:

- FC: Fator de Correção calculado pela coloração do meio de cultura.

3.5 Viabilidade Celular por Azul de Trypan

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método de exclusão com Azul de Trypan. As células foram retiradas das garrafas com o auxílio de um scraper e o conteúdo foi vertido para tubos de centrifugação de 15 mL, que foram centrifugados a 1.000 rpm por 10 minutos. Após a

centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio DMEM em diluição 1:10 com o corante Azul de Trypan, o qual cora as células inviáveis. Finalmente, foi realizada a contagem total de células viáveis em câmara de Neubauer para posterior plaqueamento das células viáveis (STROBER, 2001).

3.6 Cultura de células

Células de adenocarcinoma colorretal da linhagem Caco-2 foram cultivados em placas de poliestireno (1×10^5 células por poço) em estufa (37°C, 5% CO₂). Posteriormente, foi realizado o tratamento com o extrato vegetal em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 25 µg/mL), e novamente foram incubadas em meio de cultura DMEM suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10 % por 1 hora. Decorrido este tempo foi adicionado LPS (1µg/mL), e novamente incubadas a 37°C e 5% de CO₂ (YOON et al., 2009). Após 24 h de incubação e tratamentos em diferentes concentrações, foi realizada a extração do RNA total.

Além dos tratamentos com os extratos, cada placa de cultivo apresentou um controle positivo, no qual as células foram estimuladas apenas com LPS e um controle negativo. Cinco culturas tratadas foram utilizadas para as análises de expressão gênica.

3.7 Extração do RNA

Cerca de 1×10^5 células da linhagem Caco-2 obtidas através de cultura celular foram utilizadas para a extração de RNA a partir do método de Trizol[®] (Invitrogen, CA). O método de extração de RNA total pelo Trizol[®] é uma adaptação do método original descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). As células foram lavadas com solução de PBS 1% e posteriormente retiradas da placa de cultura através do Trizol[®], transferidas para tubos Eppendorf[®] e

incubadas por 5 minutos a 15-30°C. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio por mL de Trizol[®] e as amostras agitadas vigorosamente por 15 segundos. A seguir, foram incubadas por 2-3 minutos a 15-30°C e centrifugadas a 12000 xg por 15 minutos a 4°C. Neste momento a amostra ficará separada em fase orgânica (fenol-clorofórmio), interface e fase aquosa contendo o RNA. A fase aquosa foi transferida para tubos novos, onde o RNA foi precipitado com a adição de álcool isopropílico (0,5 mL/mL de Trizol[®]).

As amostras foram armazenadas a -20 °C por 24 horas. Após este período foram centrifugadas a 12000 xg 10 minutos a 4 °C. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75%, adicionando 1 mL de etanol/mL de Trizol[®]. As amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex e centrifugadas à 7500 xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi vertido e o precipitado seco em temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA total foi dissolvido em água ultrapura tratada com DEPC (*diethylpyrocarbonate*) e incubado por 10 minutos a 60 °C para posterior quantificação das amostras e estocagem.

3.7.1 Quantificação do RNA

O RNA total foi quantificado no aparelho L-Quant utilizando 2 µL do produto final da extração de RNA lido na absorbância de 260 nm.

3.8 Síntese do DNA complementar (DNAc)

A síntese do DNAc foi realizada a partir de 0,5 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeos (*primers*) complementares à cauda poli-A característica do RNA mensageiro (RNAm), produzindo um DNAc mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. Considerando que a fração do RNAm corresponde a aproximadamente 4-5% do RNA total, foi estimado que 0,5 µg de RNA total fornece 10 ng de DNAc. A síntese foi realizada segundo o protocolo do Kit SuperscriptII RT (Invitrogen CA[®]). Ao final da síntese o DNAc

foi armazenado a -20 °C até a amplificação pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

3.9 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real). Esta técnica permite a amplificação de sequências definidas de RNA, podendo ser usado para comparar os níveis de expressão gênica. O método de qPCR trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação por fluorescência (BUSTIN, 2000). No presente trabalho utilizou-se o corante Sybr Green I que se liga à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1000 vezes na fluorescência. Como o corante pode se ligar a qualquer fita dupla de DNA foram realizadas as chamadas curvas de desnaturação (melting-Tm), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso consegue-se a especificidade do produto amplificado, uma vez que a Tm é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado apresentarão picos de desnaturação mais baixos.

Para evitar variação entre as amostras, foi amplificado simultaneamente ao gene de interesse um gene normalizador ou constitutivo. Este gene é expresso em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do desenvolvimento não sofrendo alteração pelos tratamentos experimentais. Neste estudo, o gene constitutivo utilizado foi a β -actina. A eficiência das reações será avaliada através da curva padrão de cada gene analisado. Para a curva padrão foram realizadas diluições seriadas de DNAc obtido de cultura de células de adenocarcinoma colorretal Caco-2 não tratadas (controle positivo).

A análise da expressão gênica foi feita utilizando-se uma curva de padronização. A curva de padronização foi obtida através de reações de qPCR realizadas a partir de diluições seriadas de DNAC de controle positivo da cultura de células. Cada diluição do DNAC foi realizada em duplicata, juntamente com as amostras. As diluições foram escolhidas dentro de uma faixa que incluiu o valor esperado para o DNAC nas amostras. O momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência é definido como o CT, que é inversamente proporcional ao log da quantidade de DNAC (ng) (HIGUCHI, et al., 1993). Portanto, a curva de padronização é gerada jogando-se os valores de CT, num intervalo de 95% de confiança, contra a intensidade da fluorescência do Sybr green I, correspondendo ao logaritmo das nanogramas de DNAC.

3.9.1 Análise da Expressão Gênica

Os *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNAC específicos para o *NF-κB* e *p38α* foram desenhados a partir da sequência publicada de cada gene utilizando-se a ferramenta online Primer3 (ROZEN; SKALETSKI, 2000), obedecendo a alguns critérios: 18 a 30 nucleotídeos; posicionamento preferencial dos oligonucleotídeos em áreas de transição intron-éxon para inviabilizar a amplificação indesejada de DNA genômico; proporção de G-C entre 50 e 60%; extremidade 3' preferencialmente ocupada por C ou G para fortalecer a hibridização neste ponto crítico; evitar sequencias complementares entre o par de *primers* para inibir a formação de dímeros. Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados por Invitrogen® CA. A Tabela 1 resume a sequência dos oligonucleotídeos de interesse deste estudo, bem como o tamanho dos fragmentos de DNAC amplificados.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos dos genes de interesse.

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho fragmento (pb)	Referência
<i>NF-κB</i> <i>sense</i> <i>antisense</i>	ACACCGTGTAACCAAAGCC CAGCCAGTGTGTGATTGCT	209	http://bioinfo.ut.ee/primer3
<i>p38α</i> <i>sense</i> <i>antisense</i>	CAGTGGGATGCATAATGGCC GCATCTTCTCCAGCAAGTCG	243	http://bioinfo.ut.ee/primer3
<i>TNF-α</i> <i>sense</i> <i>antisense</i>	CCCTGGTATGAGCCCATCTATC AAAGTAGACCTGCCCAGACTCG	120	Abbas et al., 2014
<i>ACTB</i> <i>sense</i> <i>antisense</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	140	http://bioinfo.ut.ee/primer3

A amplificação do DNAc e a quantificação relativa foi realizada utilizando-se o sistema de qPCR em tempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o Kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em um volume total de 25 µL. A tabela 3 demonstra as quantidades de reagentes padronizadas para cada gene de forma a obter melhor eficiência de reação. Foram realizadas amplificação e leitura de cada amostra em duplicata, com o seguinte protocolo para todos os genes: incubação inicial por 3 min a 94 °C, seguida por 45 ciclos de 30 s de desnaturação a 94 °C, 30 s de anelamento a 55 °C e 30 s de extensão a 60 °C.

Para confirmar a especificidade da reação, foi realizada a curva de dissociação para cada par de *primer*, com a análise da temperatura de *melting* de cada gene (Apêndice A).

3.10 Metodologia de análise de dados

Os dados foram tabulados e analisados com estatística descritiva empregando-se o software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, IBM) versão 20.0 e GraphPadPrism 5.0. A comparação entre os controles foi realizada através do Teste t de Student, e os efeitos dos extratos foram analisados por ANOVA seguida de Teste de Tukey. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Viabilidade Celular por Alamar Blue

Através do método de Alamar Blue pode-se observar que os extratos etanólico e hexânico das folhas de *Calypttranthes grandifolia* O.Berg não interferem na viabilidade celular quando comparados ao controle negativo. O controle negativo apresentou viabilidade de 62,6% ($\pm 4,367$), sendo que para os extratos etanólico e hexânico, nas concentrações testadas, os percentuais de viabilidade foram semelhantes ao controle (Figura 2).

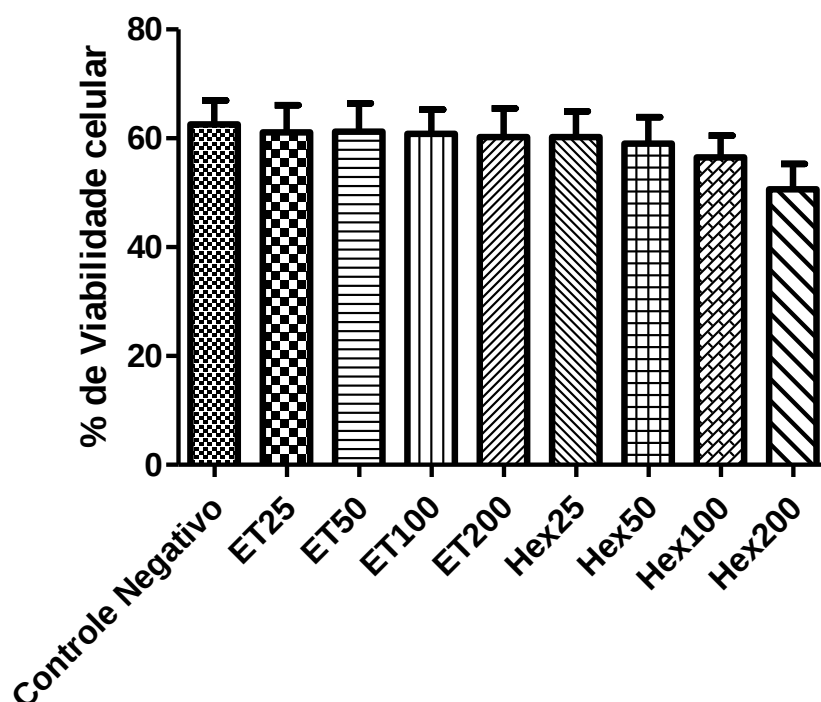


FIGURA 2. Percentual de Viabilidade Celular pelo método de Alamar Blue. N=3 experimentos. ANOVA, seguida do Teste de Tukey, $p=0,775$.

4.2 Análise da Expressão Gênica

Para análise dos genes de interesse foram realizadas curvas de diluição com um pool do controle positivo. O controle positivo foi constituído de células Caco-2 estimuladas por LPS. Já o controle negativo foi constituído apenas por células em meio de cultura. A comparação entre os controles foi realizada com o objetivo de verificar a diferença de expressão a partir do estímulo pelo LPS.

Para o gene *TNF- α* , foi observado uma tendência ao aumento da sua expressão após o tratamento com LPS (Figura 3). Já para os genes *NF- κ B* e *p38 α* , não foi observada estimulação da expressão através do tratamento com LPS. Assim, a expressão destes genes manteve-se estável tanto no controle negativo quanto no controle positivo (Figuras 4 e 5).

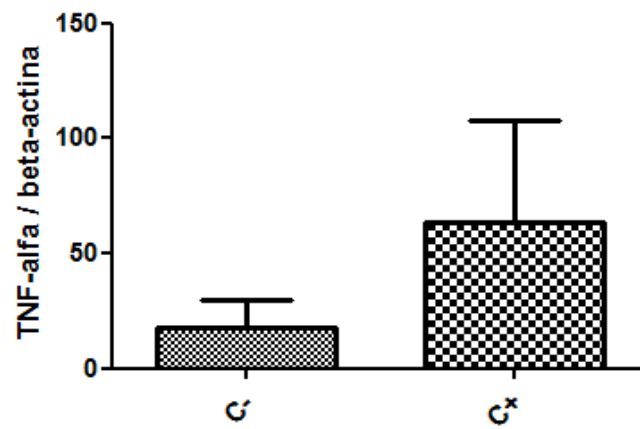


FIGURA 3: Efeito do LPS na expressão do *TNF-α* comparado ao controle negativo (sem LPS). Dados expressos como média ± EP. $P=0.337$ (Teste t de student). $N=5$ experimentos.

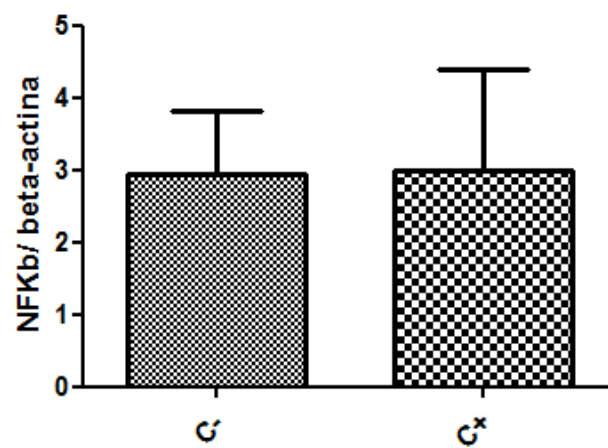


FIGURA 4: Efeito do LPS na expressão do *NF-κB* comparado ao controle negativo (sem LPS). Dados expressos como média ± EP. $P=0.97$ (Teste t de student). $N=5$ experimentos.

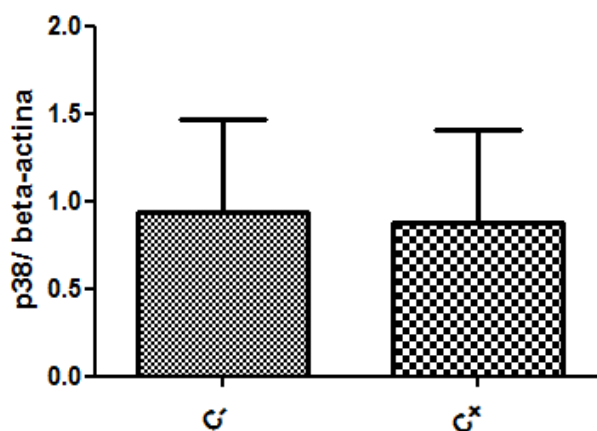


FIGURA 5: Efeito do LPS na expressão do $p38\alpha$ se comparado ao controle negativo (sem LPS). Dados expressos como média $\pm$ EP. $P=0.937$ (Teste t de student). $N=5$ experimentos

4.2.1 Avaliação do efeito do extrato etanólico de *Calyptanthes grandifolia* O. Berg na expressão de $TNF-\alpha$, $NF-\kappa B$ e $p38\alpha$

Na avaliação do efeito do extrato etanólico de *Calyptanthes grandifolia* na expressão dos genes de interesse, verificou-se com relação ao $TNF-\alpha$ uma diminuição da sua expressão, sendo significativa nas concentrações de 100 e 200 $\mu g/mL$ ($p<0,025$) (Figura 6).

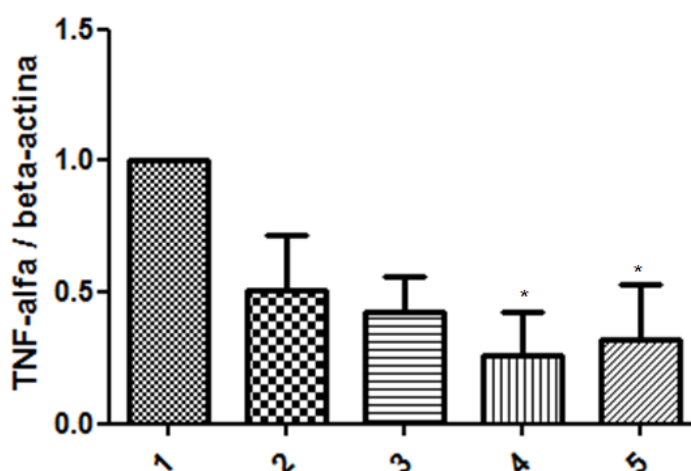


FIGURA 6: Gráfico representativo do efeito do extrato Etanólico (EtOH) na expressão do gene $TNF-\alpha$ em diferentes concentrações em relação ao controle: grupo 1-Controle positivo, 2-EtOH25+LPS, 3-EtOH50+LPS, 4-EtOH100+LPS, 5-EtOH200+LPS. * $p<0,025$ em relação ao

controle. ANOVA e teste de Tukey. Dados expressos como média $\pm$ EP da média. n=5 experimentos.

Com relação ao gene *NF- κ B*, sua expressão apresentou uma tendência constante em todos os tratamentos, não apresentando nenhuma variação significativa (Figura 7). Todavia, a expressão do gene *p38 α* apresentou uma tendência a aumentar, conforme o tratamento, porém, este aumento não foi significativo (Figura 8).

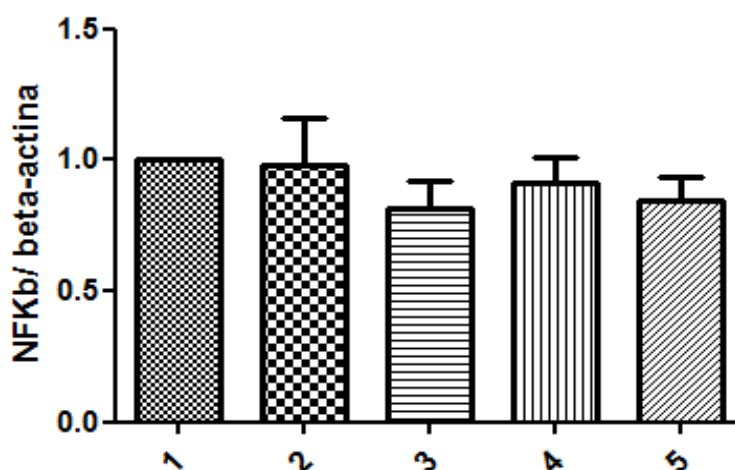


FIGURA 7: Gráfico representativo do efeito do extrato Etanólico (EtOH) na expressão do gene *NF- κ B* em diferentes concentrações em relação ao controle: grupo 1-controle positivo (LPS), 2-EtOH25+LPS, 3-EtOH50+LPS, 4-EtOH100+LPS, 5-EtOH200+LPS. p=0,790. ANOVA e teste de Tukey. Dados expressos como média $\pm$ EP da média. n=5 experimentos.

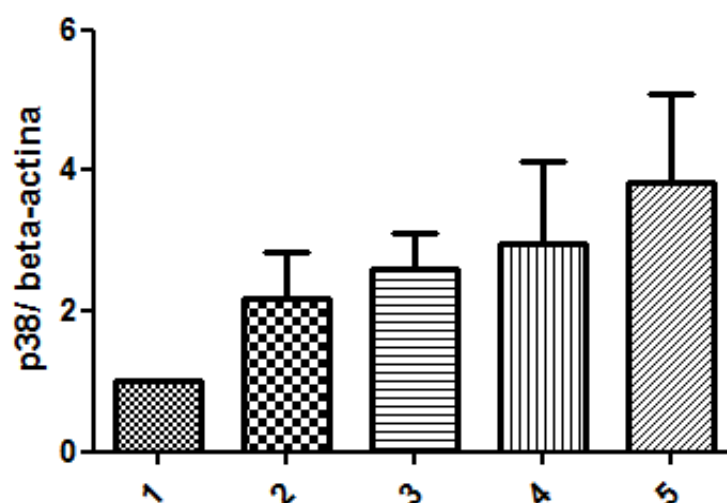


FIGURA 8: Gráfico representativo do efeito do extrato Etanólico (EtOH) na expressão do gene *p38α* em diferentes concentrações em relação ao controle: grupo 1-controle positivo, 2-EtOH25+LPS, 3-EtOH50+LPS, 4-EtOH100+LPS, 5-EtOH200+LPS. $p=0,1513$. ANOVA e teste de Tukey. Dados expressos como média $\pm$ EP da média. $n=5$ experimentos.

4.2.2 Avaliação do efeito do extrato Hexânico de *Calyptanthes grandifolia* O. Berg. na expressão de *TNF-α*, *NF-κB* e *p38α*

A expressão dos genes *TNF-α*, *NF-κB* e *p38α* no tratamento com extrato hexânico não demonstrou nenhuma variação significativa em relação ao controle (Figuras 9, 10 e 11, respectivamente).

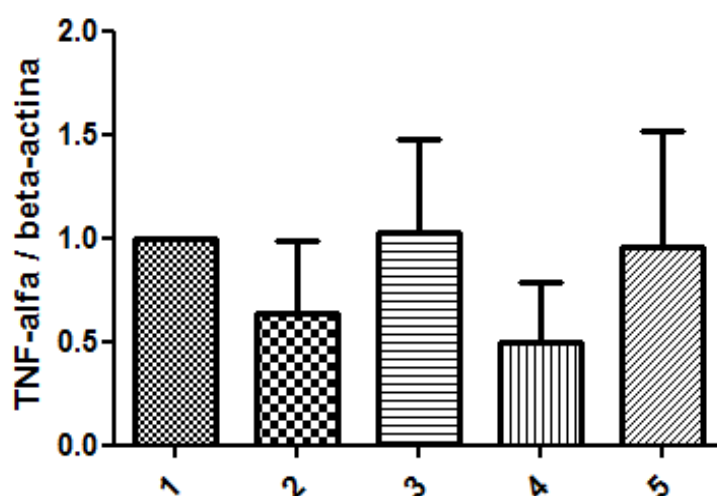


FIGURA 9: Gráfico representativo do efeito do extrato Hexânico na expressão do gene *TNF- α* em diferentes concentrações em relação ao controle: grupo 1-Controle positivo, 2-Hex25+LPS, 3-Hex50+LPS, 4-Hex100+LPS, 5-Hex200+LPS. $p=0,490$. ANOVA e teste de Tukey. Dados expressos como média $\pm$ EP da média. $n=5$ experimentos.

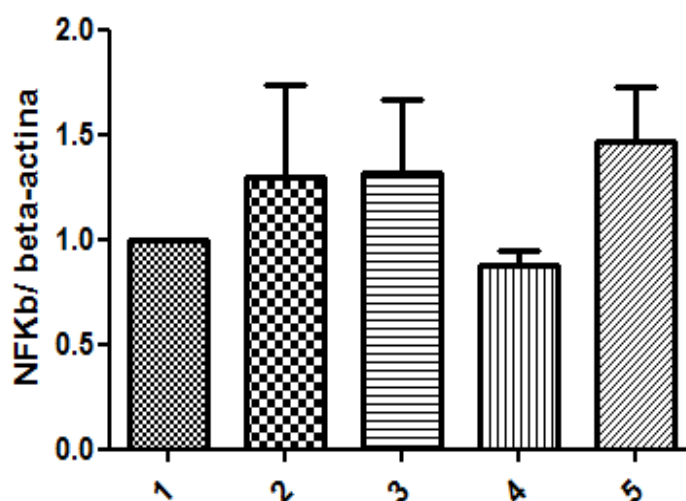


FIGURA 10: Gráfico representativo do efeito do extrato Hexânico (Hex) na expressão do gene *NF- κ B* em diferentes concentrações em relação ao controle: grupo 1-Controle positivo, 2-Hex25+LPS, 3-Hex50+LPS, 4-Hex100+LPS, 5-Hex200+LPS. $p=0,441$. ANOVA e teste de Tukey. Dados expressos como média $\pm$ EP da média. $n=5$ experimentos.

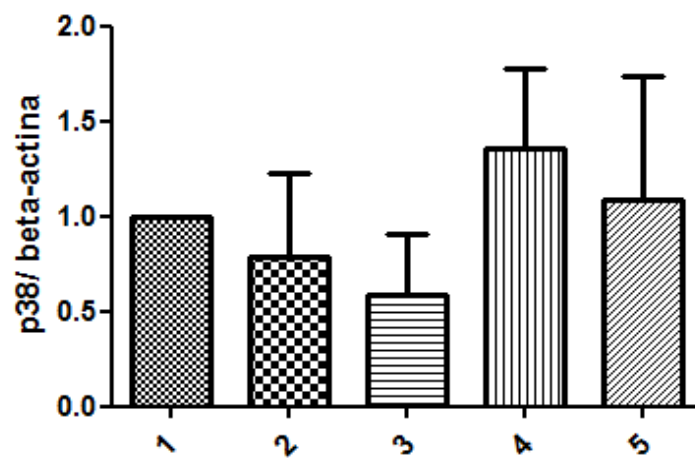


FIGURA 11: Gráfico representativo do efeito do extrato Hexânico o na expressão do gene *p38α* em diferentes concentrações em relação ao controle: grupo 1-Controle positivo, 2-Hex25+LPS, 3-Hex50+LPS, 4-Hex100+LPS, 5-Hex200+LPS. $p=0,622$. ANOVA e teste de Tukey. Dados expressos como média $\pm$ EP da média. $n=5$ experimentos.

5 DISCUSSÃO

A presente pesquisa avaliou o efeito do extrato de *Calypttranthes grandifolia* O.Berg. na expressão dos genes *TNF- α* , *NF- κ B* e *p38 α* . Em relação ao estímulo por LPS na expressão do gene *TNF- α* , houve um aumento da sua expressão no controle positivo (estimulado com LPS) em relação ao controle negativo (sem LPS). A expressão de *p38 α* e *NF- κ B* não foi alterada no controle positivo em relação ao negativo. Herath et al. (2013) demonstraram que diferentes sorotipos de LPS podem produzir respostas diferentes na estimulação celular. Por exemplo, em células humanas de fibroblastos gengivais (HGF) não houve ativação da via de *NF- κ B* com LPS 1435/1449. Já o LPS1690 ativou significativamente a via. Outros genes pró-inflamatórios também apresentaram modificação na sua ativação através dos diferentes sorotipos de LPS.

Avaliando o efeito do tratamento com extratos de *Calypttranthes grandifolia* O.Berg., na expressão gênica de *TNF- α* , pode-se observar uma tendência para diminuição da expressão em ambos os extratos. Contudo, apenas no extrato etanólico nas concentrações de 100 e 200 μ g/mL foi possível observar sua redução significativa. Até o presente momento, não existem estudos avaliando o efeito desta planta na expressão de *TNF- α* , contudo, Ferreira et al. (2013) avaliaram a atividade anti-inflamatória de extratos de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) e a produção de NO (óxido nítrico),

TNF- α e IL-10 em macrófagos J774.A1 estimulados com LPS/INF- γ . O edema de pata em camundongos foi inibido através da administração oral dos extratos. O extrato inibiu a produção de NO, *TNF- α* e aumentou a produção de IL-10. Assim, pode-se relacionar a atividade anti-inflamatória do extrato com a inibição das citocinas pró-inflamatórias e aumento de IL-10. Li et al. (2015) avaliou a atividade de flavonóides em células Raw 264.7 e observou inibição de NO, *TNF- α* , IL-1 β e IL-6, demonstrando um importante papel na atividade anti-inflamatória.

A relação da inflamação crônica, produção de citocinas e o câncer colorretal é descrita através do aparecimento da inflamação e posterior atividade carcinogênica. Esta é provocada por fatores associados ao câncer e o recrutamento de células imunológicas presentes do ambiente do tumor. Citocinas como *TNF- α* , IL-6, IL-12 e IL-23 tem atividade pró-inflamatória e possuem grande importância tanto na manutenção da inflamação quanto na sobrevivência do tumor a partir da atividade antiapoptótica, indução da angiogênese, desenvolvimento do tumor e migração (KLAMPFER et al., 2011; LIN et al 2007).

O presente estudo não demonstrou alteração na expressão do *NF- κ B* nos diferentes extratos e concentrações testadas. A ativação de *NF- κ B* em células Caco-2 pode estar relacionada ao estado de diferenciação celular. As vias de sinalização do *NF- κ B* ou IKK não existem isoladamente, por isso, diversos mecanismos podem integrar sua atividade com outras vias de sinalização (PERKINS, 2007). O *NF- κ B* é uma proteína que modula a resposta apoptótica, sendo um fator de transcrição que pode tanto proteger quanto contribuir para a apoptose (FOO et al 1999). Assim, sabe-se que o *NF- κ B* atua na sobrevivência celular e inflamação (VOUSDEN et al., 2002; MELINO et al., 2002; PERKINS & GILMORE, 2006) e também pode participar na ativação da morte celular (PERKINS & GILMORE, 2006; JANICKE et al., 2008; DAJEE et

al., 2003; RYAN et al., 2004). Martin et al. (2009) observou que o *NF- κ B* pode ter papel importante em sinais apoptóticos na via dependente de p73.

O *NF- κ B* é um regulador central de respostas imunes, e tem importante função na expressão de genes de citocinas como IL-2, IL-6, MCP-1 e CD40-L. Além disso, também está envolvido na expressão de genes relacionados na proliferação celular e sobrevivência, como ciclina D1, ciclina D2, *c-myc*, *c-myb*, cicloxigenase 2 (COX-2), *bcl-2* e *bcl-xl* (CLÉMENT et al., 2008; VALLABHAPURAPU & KARIN, 2009). Assim, o *NF- κ B* pode ser considerado um promotor do tumor (PIKARSKY et al., 2004; WOLSKA et al., 2009). Com isso, podemos sugerir que o *NF- κ B* não foi ativado seguindo a hipótese de que sinais anti-inflamatórios estão sendo estimulados.

O presente estudo também avaliou a expressão do gene *p38 α* , sendo que não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Contudo, este apresentou uma tendência a aumentar sua expressão no extrato etanólico. A tendência para o aumento foi observada de forma gradativa em todas as concentrações, sendo que a maior expressão foi encontrada na concentração de 200 μ g/mL.

A ativação das isoformas de *p38* pode ser controlada especificamente por diferentes reguladores e coativada por diversas combinações de reguladores (HU et al., 1999; ENSLEN et al., 1998). O *p38* MAPK pode ativar outras quinases e consequentemente regular diversas respostas celulares. Desta forma, a sinalização do *p38* pode estar relacionada com inflamação, ciclo celular, morte celular, desenvolvimento, diferenciação, senescência e tumorigênese (ZARUBIN & HAN, 2005).

O efeito antitumoral de diversas drogas quimioterápicas está baseado na ativação de apoptose através do *p38 α* . Porém, deve-se salientar que esta quinase está relacionada a diversas respostas, podendo inclusive estar

envolvida com resistência à quimioterapia em alguns tipos de tumores (PORRAS & GUERRERO, 2011).

Campbell et al. (2004) demonstraram que uma variante de *p38α* MAPK pode inibir a produção de *TNF-α* em macrófagos induzidos por LPS via pós-transcricional. Ainda, o *p38* regulou negativamente a expressão de *NF-κB*, o que permite um mecanismo de controle transcricional do *TNF-α* já que o fator nuclear é necessário para sua expressão.

O *p38* MAPK pode regular a morte celular de duas formas, podendo atuar na sobrevivência celular e também na morte celular através de diferentes mecanismos. Porém, a função específica do *p38* na apoptose pode estar relacionada com o tipo celular, estímulo e isoforma (NEBREDÁ & PORRAS, 2000; WAGNER & NEBREDÁ, 2009). Estudos já demonstraram que existe uma forte relação da atividade do *p38α* e *p38β* na apoptose em diversos tipos celulares (CIESIELSKI-TRESKA et al., 2001; DE ZUTTER & DAVIS, 2001; GHATAN et al., 2000; LE-NICULESCU et al., 1999; MACKAY & MOCHLY-ROSEN, 1999; SAURIN et al., 2000; WANG et al., 1998b). O *p38α* pode induzir a apoptose a partir da regulação positiva de proteínas como Fas e Bax e regulação negativa de ERK e Akt, que são vias de sobrevivência celular (PORRAS et al., 2004; ZULUAGA et al., 2007).

Apesar do papel pró-apoptótico, o *p38* MAPK já foi relacionado com atividade anti-apoptótica (HÉRON-MILHAVET & LEROITH, 2002; OKAMOTO et al., 2000; PARK et al., 2002; ZHANG et al., 2003). Comes et al., (2007) demonstrou que o *p38α* pode induzir a sobrevivência das células de câncer colorretal através da inibição da autofagia. Outro mecanismo envolvido na sobrevivência induzida por *p38α* é a ativação da via ATF6α-Rheb-mTOR, que promove a sobrevivência de células tumorais dormentes in vivo (SCHEWE & AGUIRRE-GHISO, 2008).

O mTOR é uma proteína quinase que pode atuar no desenvolvimento e proliferação celular, tradução de mRNA, sobrevivência e progressão do ciclo celular (JACINTO et al., 2004; THOREEN et al., 2012). mTOR pode ativar duas proteínas funcionalmente diferentes, mTORC1 e mTORC2, que atuam na via de sinalização ativada em resposta a um estímulo de stress. Esta via, porém, ainda não está totalmente descrita (BOVÈ et al., 2011). Estudo utilizando Ultrassom Terapêutico estimulou o crescimento de células MC3T3-E1 através da ativação de *NF-κB* e mTOR pela via *p38α* MAPK (TASSINARY et al., 2015).

Horie et al (2007) demonstrou que a partir da inibição de *p38* MAPK em células de linfoma de Burkitt (BL), pode-se observar a diminuição da expressão do mRNA de IL-10, e, conseqüentemente, o crescimento celular também foi inibido. De forma semelhante, em monócitos humanos também pode-se observar que a partir da inibição de JNK e *p38*, houve diminuição significativa da expressão de IL-10 (DOBREVA et al., 2009).

A IL-10 é uma citocina com atividade no sistema imune, atuando na homeostase, e apresenta propriedades anti-inflamatórias, podendo reprimir a expressão de citocinas inflamatórias como *TNF-α*, IL-6 e IL-1 (DONNELLY et al., 1999). A via de sinalização TLR pode ativar a via de *p38*, que pode induzir a expressão de IL-10 (SARAIVA & O'GARRA, 2010).

Citocinas como fator inibidor de migração, fator de crescimento transformador beta 1, *TNF-α*, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23 foram associadas ao desenvolvimento de câncer. Citocinas como IL-5, IL-6, IL-10 e IL-22 e fatores de crescimento promovem o desenvolvimento de tumor e metástase, através da inibição da apoptose (DJALDETTI & BESSLER, 2014).

Embora não tenhamos encontrado diferenças significativas nos níveis de RNAm dos genes *p38* e *NF-κB*, mais estudos são necessários com maior número amostral e também a nível proteico, para verificar a presença e ativação destas proteínas. O aumento nos níveis de RNAm não é diretamente

proporcional a quantidade de proteína traduzida, devido a modificações pós-transcricionais e traducionais.

Os extratos estudados não interferiram na viabilidade celular quando comparados ao controle negativo. Segundo Instituto Nacional Americano do Câncer (NCI), um extrato pode ser considerado ativo, ou seja, citotóxico, quando apresentar citotoxicidade com valores de $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ (Concentração de Inibição Média). Neste aspecto, os extratos citotóxicos podem ser possíveis candidatos para estudos anticarcinogênicos (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990). Porém, é importante ressaltar que estes extratos devem ser testados em outras linhagens celulares a fim de evidenciar uma possível citotoxicidade seletiva. O estudo de Saleh et al. (2014) demonstrou que o óleo essencial de *Artemisia vulgaris* inibiu o crescimento de células HL-60. Através de avaliação por citometria de fluxo, foi possível observar que o efeito citotóxico do óleo é mediado por uma apoptose dependente de caspase. O extrato foi capaz de induzir a apoptose em diversas linhagens de células cancerosas mas não em células não cancerosas. Demonstrando uma citotoxicidade seletiva. Tahir et al (2015) demonstraram que em células HT29, o extrato de gengibre em altas concentrações diminuiu a viabilidade celular significativamente. Além disso, o extrato provocou um aumento dose-dependente de fragmentação do DNA, indicando alto nível de apoptose. Houve a supressão da expressão de genes inflamatórios via *NF- κ B*.

A atividade antioxidante também foi determinada nos extratos etanólico e hexânico de *Calyptanthus grandifolia* pelo grupo de pesquisa (dados não publicados). Esta atividade foi avaliada a partir do teste da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Os resultados demonstraram que o extrato hexânico não apresentou atividade antioxidante. Já o extrato etanólico demonstrou uma atividade antioxidante dose dependente.

A atividade antioxidante observada pode ser relacionada com a possível atividade anti-inflamatória do extrato, através dos resultados encontrados na expressão gênica. O extrato etanólico possui considerável atividade antioxidante quando comparado ao hexânico, o que pode estar correlacionado com a diminuição da expressão gênica do *TNF- α* .

Houve uma diferença no comportamento da expressão dos genes em relação aos extratos, sendo que o extrato etanólico se mostrou mais linear em relação ao hexânico. Isto pode ser explicado devido a fitoquímica encontrada no extrato. Resultados anteriores do grupo de pesquisa (dados não publicados) demonstraram a presença de flavonoides, triterpenoides e taninos. No extrato hexânico não foram identificados nenhum dos constituintes avaliados. A família Myrtaceae pode apresentar metabólitos secundários importantes como taninos, flavonoides, óleos essenciais, alcoóis sesquiterpenoides e ácidos triterpenoides (JORGE et al., 2000). Estudos indicam que flavonoides podem inibir citocinas inflamatórias como o *TNF- α* (LI et al., 2015; CONTRERAS et al., 2015; HANÁKOVÁ et al., 2015; THICHANPIANG & WONGPRASERT, 2015).

Burodom & Itharat (2013) avaliaram a atividade do extrato etanólico de um preparado de plantas denominado Bejakul na produção de citocinas pro-inflamatórias induzidas por LPS em células Caco-2. Foi demonstrado que o extrato diminuiu significativamente o *TNF- α* , IL-1b e IL-6, sugerindo uma potencial atividade anti-inflamatória do extrato.

Doan et al. (2009) detectaram níveis baixos de TLR4 em células da linhagem Caco-2 em comparação a outras células de câncer colorretal. Além disso, a expressão de Akt não foi detectada após a estimulação com LPS. Apesar destes resultados, estas vias são estudadas na linhagem Caco-2 e demonstram atuação importante nas vias de sinalização celular. Segundo Tolba & Abdel-Rahman (2015), o receptor de estrogênio ER- β é expresso em níveis mais elevados em células Caco-2. Ainda, seus níveis são mais elevados com o tratamento de Pterostilbeno (PT). Este composto apresenta efeito

antioxidante e anticâncer mediados por ER- β . O tratamento com PT diminuiu significativamente a fosforilação de Akt e ERK e aumentou FOXO-1 e p27^{kip1} em células Caco-2. Shimizu et al (2015) demonstraram que a molécula 3-oxo-C12-homoserina lactona, em concentrações baixas, pode induzir a apoptose em células Caco-2 não diferenciadas através da supressão da atividade da via Akt. Wang et al. (2015) avaliaram a expressão de TLR4 e sua interação com *NF- κ B* em células Caco-2 estimuladas por LPS e tratadas com Wogonina. Foi demonstrado que o tratamento inibiu a expressão de TLR4 e também reduziu a translocação de *NF- κ B* para o núcleo.

Considerando a diminuição significativa de *TNF- α* no tratamento de células Caco-2 com o extrato etanólico de *Calyptanthes grandifolia* O.Berg., a atividade antioxidante do extrato e a capacidade de não alterar a viabilidade celular, sugerimos que este extrato pode apresentar potencial anti-inflamatório. Porém, estudos posteriores devem ser realizados a fim de elucidar a via de sinalização que pode estar sendo ativada (Figura 12). Tendo em vista a variação entre os experimentos e possíveis regulações pós transcricionais, sugere-se a análise de outros genes a fim de avaliar as possíveis vias de atuação. Além disso, torna-se importante a análise da expressão de proteínas, a fim de comprovar que os genes expressos são traduzidos e seus respectivos níveis de tradução.

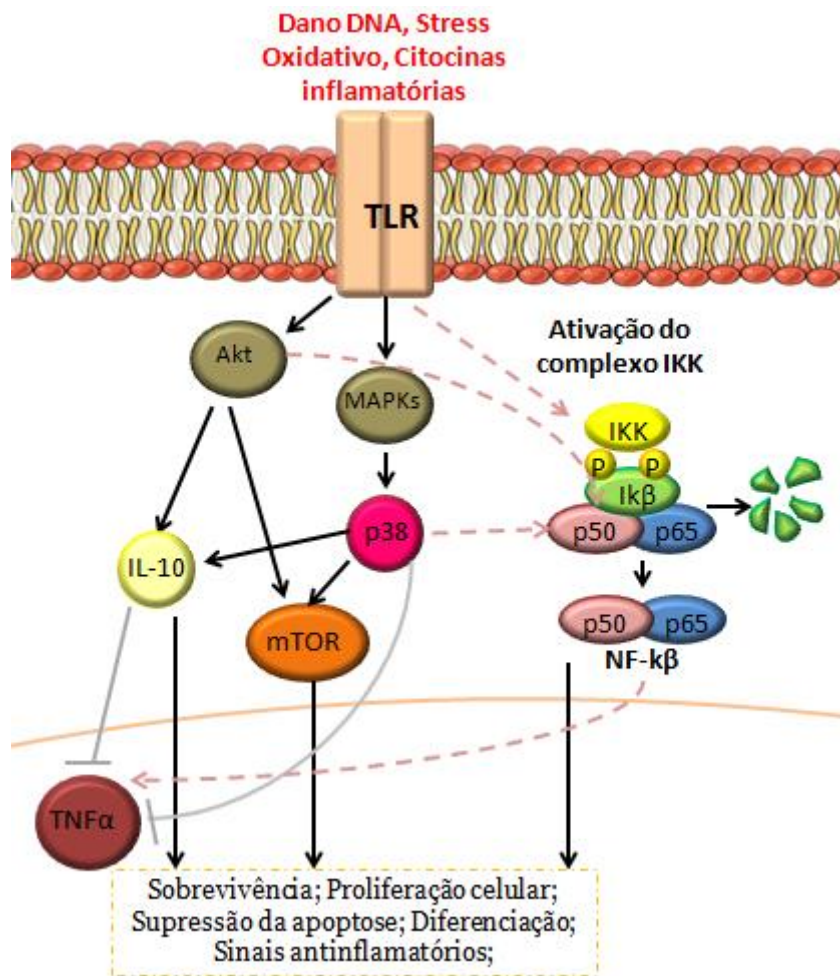


FIGURA 12: Possível mecanismo utilizado por células Caco-2 para proliferação celular. Fonte: Do Autor.

6 CONCLUSÃO

O extrato etanólico em concentrações de 100 e 200 µg/mL de *Calyptanthes grandifolia*. pode diminuir significativamente a expressão gênica do *TNF-α* em células da linhagem Caco-2. Não houve diferença significativa na expressão gênica do *p38α* e *NF-κB*. Contudo, o extrato hexânico não apresentou variações significativas nos genes testados em nenhuma das concentrações estudadas.

Os extratos não foram considerados citotóxicos, não sendo candidatos para estudos anticarcinogênicos nesta linhagem. Porém, estudos utilizando outras linhagens celulares podem ser realizados em busca de uma citotoxicidade seletiva.

Sugerimos que o extrato possui um potencial anti-inflamatório através da diminuição do *TNF-α*. Assim, torna-se importante a verificação desta via em linhagens de macrófagos a fim de verificar este possível potencial.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a doubleedged sword. **Nat Rev Immunol**, v. 3, p. 745–756, 2003.

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 1397-1421, 2006.

AISHA, A.F.; ISMAIL, Z.; ABU-SALAH, K.M.; SIDDIQUI, J.M.; GHAFAR, G.; MAJID, A.M.S.A. Syzygium campanutatum korth methanolic extract inhibits angiogenesis and tumor growth in nude mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 168, 2013.

AMBROSINO, C.; NEBREDIA, A.R. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. **Biol Cell**, v. 93, p. 47–51, 2001.

ARADHYA, S.; NELSON, D.L. NF-KB signaling and human disease. **Curr Opin. Genet Dev**, v. 11, p. 300–306, 2001.

ARAVINDARAM, K.; YANG, N.S. Anti-inflammatory plant natural products for cancer therapy. **Planta Med**, v. 76, p. 1103-1117, 2010.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305–1308, 1998.

AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 62, p. 55-61, 2003.

BAEUEERLE, P.A.; BALTIMORE, D.I. Kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. **Science**, v. 242, n. 4878, p. 540-6, 1988.

BAKER, S.J.; REDDY, E.P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. **Oncogene**, v. 17, p. 3261–3270, 1998.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, p. 539-45, 2001.

BARNES, P.J. Cytokines and mediators of chronic asthma. **Am J Crit Care Med**, v. 150, p. 42-9, 1994.

BARTLETT, D.L.; MA, G. ALEXANDER, H.R.; LIBUTTI, S.K.; FRAKER, D.L. Isolated limb reperfusion with tumor necrosis factor and melphalan in patients with extremity melanoma after failure of isolated limb perfusion with chemotherapeutics. **Cancer**, v. 80, p. 2084–2090, 1997.

BATES, R.C.; MERCURIO, A.M. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. **Mol Biol Cell**, v. 14, p. 1790–800, 2003.

BAZZONI, F.; BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **N Engl J Med**, v. 334, p. 1717–1725, 1996.

BEG, A.A.; BALTIMORE, D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. **Science**, v. 274, p. 782–784, 1996.

BEMELMANS, M.H.; VAN TITS, L.J.; BUURMAN, W.A. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. **Crit Rev Immunol**, v. 16, p. 1–11, 1996.

- BERTAGNOLLI, M.M.; EAGLE, C.J.; ZAUBER, A.G.; REDSTON, M.; SOLOMON, S.D.; KIM, K.; et al. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. **N Engl J Med**, v. 355, p. 873–84, 2006.
- BHANOT, A.; SHARMA, R.; NOOLVI, M.N. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. **Int J Phytomed**, v. 3, p. 9–26, 2011.
- BRAGANÇA, L.A.R. Plantas Medicinais Antidiabéticas. Uma Abordagem Multidisciplinar. **Editora da Universidade Federal Fluminense**: Niterói, Rio de Janeiro, Brasil, 1996.
- BRANCHO, D.; TANAKA, N.; JAESCHKE, A.; VENTURA, J.J.; KELKAR, N.; TANAKA, Y. et al. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. **Genes Dev**. v. 17, p. 1969– 1978, 2003.
- BRANDÃO, H.N., DAVID, J.P., COUTO, R.D., NASCIMENTO, J.A.P., DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.
- BOVÈ, J.; MARTINEZ-VICENTE, M.; MILA, V. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insight. **Nat Rev Neurosci**. v.12, p.437-452, 2011.
- BULAVIN, D.V.; DEMIDOV, O.N.; SAITO, S.; KAURANIEMI, P.; PHILLIPS, C.; AMUNDSON, S.A.; et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. **Nat Genet.**; v. 31, p. 210–215, 2002.
- BULAVIN DV, FORNACE AJ JR. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. **Adv Cancer Res**, v. 92, p. 95–118, 2004.
- BURODOM, A.; ITHARAT, A. Inflammatory suppressive effect of Benjakul, a Thai traditional medicine on intestinal epithelial cell line. **Journal of Medicinal Plants Research**. v.7, n.44, p.3286-3291, 2013.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, n.2, p. 169-93, 2000.

BYEON, S. E., LEE J., YOO B. C., SUNG, G. H., KIM, T.W., PARK, H.J., CHO, J.Y. P38-Targeted inhibition of interleukin-12 expression by ethanol extract from *Cordyceps bassiana* in lipopolysaccharide-activated macrophages,. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v. 33, n. 1, p. 90–96, 2011.

CAMPBELL, J.; CIESIELSKI, C.J.; DENYS, A.E.H.A.; FELDMANN, M.; BRENNAN, F.M.; HORWOOD N.J. et al. A Novel Mechanism for TNF- α Regulation by p38 MAPK: Involvement of NF- κ B with Implications for Therapy in Rheumatoid Arthritis. **J Immunol**. v.173, p.6928-37, 2004.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, p. 3666–3670. 1975

CHAN, A.T.; OGINO, S.; FUCHS, C.S. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. **N Engl J Med**, v. 356, p. 2131–42, 2007.

CHANG, H.Y.; SNEDDON, J.B.; ALIZADEH, A.A.; SOOD, R.; WEST, R.B.; MONTGOMERY, K.; et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. **PLoS Biol**, v. 2, p. 206-214, 2004.

CHEN, F.; CASTRANOVA, V.; SHI, X.; DEMERS, L. M. New insights into the role of nuclear factor-kappa-B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. **Clin Chem**, v.45, p. 7-17, 1999.

CHENG,J.F., ISHIKAWA, A., ONO,Y., ARRHENIUS, T., NADZAN, A. Novel Chromene Derivatives as TNF- α Inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v.13, p. 3647–3650, 2003.

CHETAN, B.S., NIMESH, M.S., MANISH, P.P., RANJAN, G.P. Microwave assisted synthesis of novel 4H-chromene derivatives bearing phenoxy pyrazole and their antimicrobial activity assess. **J Serb Chem Soc.** v. 77, p. 1–17, 2012.

CHEW, J.; BISWAS, S.; SHREERAM, S.; HUMAIDI, M.; WONG, E. T.; DHILLON, M. K.; et al. WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF- κ B signalling. **Nat Cell Biol.** v. 11, p. 659–666, 2009.

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.** v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CIESIELSKI-TRESKA, J.; ULRICH, G.; CHASSEROT-GOLAZ, S.; ZWILLER, J.; REVEL, M.O.; AUNIS, D.; BADER, M.F. Mechanisms underlying neuronal death induced by chromogranin A-activated microglia. **J Biol Chem.** v.20, n.276, p.13113-20, 2001.

CLÉMENT, J.F.; MELOCHE, S.; SERVANT, M.J. The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. **Cell Res.** v.18, n.9, p.889-99, 2008.

COMES, F.; MATRONE, A.; LASTELLA, P.; NICO, B.; SUSCA, F.C.; BAGNULO, R. et al. A novel cell type-specific role of p38 α in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. **Cell Death Differ.** v.14, n.4, p.693-702, 2007.

CONTRERAS, T.C.; RICCIARDI, E.; CREMONINI, E.; OTEIZA, P.I. (-)-Epicatechin in the prevention of tumor necrosis α -induced loss of Caco-2 cell barrier integrity. **Arch Biochem Biophys.** v.1, n.573, p.84-91, 2015.

CORREA, R. G. C.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S.; GOTTLIEB, O. R.; Mourão, J. C.; Marx, M. C.; Moraes, A. A.; Moura, L. L.; Magalhães, M. T.; **Acta Amaz.** v. 2, p. 53, 1972.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-7, 2002.

CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. Anticancer agents from natural products. **CRC Press**; p. 137-150, 2005.

CUENDA, A.; ROUSSEAU, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, p. 1358–1375, 2007.

DAJEE, M.; LAZAROV, M.; ZHANG, J.Y.; CAI, T.; GREEN, C.L.; RUSSELL, A.J.; et al. NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. **Nature**.v.421, p.639-643, 2003.

DE ZUTTER, G.S.; DAVIS, R.J. Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.22, n.98, p.6168-73, 2001.

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases. **Oncogene**, v. 22, p. 8543–8567, 2003.

DEVIN, A.; COOK, A.; LIN, Y.; RODRIGUEZ, Y.; KELLIHER, M.; LIU, Z. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. **Immunity**, v. 12, p. 419–429, 2000.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. **Editora Unesp**: São Paulo, Brasil, ed. 2; 2002.

DJALDETTI, M.; BESSLER, H. Modulators affecting the immune dialogue between human immune and colon cancer cells. **World J Gastrointest Oncol**. v.15, n.6, p.129–138, 2014.

DOAN, H.Q.; BOWEN, K.A.; JACKSON, L.A.; EVERS, B.M.^{1,2} Toll-like Receptor 4 Activation Increases Akt Phosphorylation in Colon Cancer Cells. **Anticancer research**. v.29, p.2473-2478, 2009.

DOBREVA, Z.G.; MITEVA, L.D.; STANILOVA, S.A. The inhibition of JNK and p38 MAPKs downregulates IL-10 and differentially affects c-Jun gene expression in human monocytes. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. v.31, n.2, p.195-201, 2009.

DOLADO, I.; NEBREDA, A. R. Regulation of tumorigenesis by p38 α MAP kinase. **Topics in Current Genetics: Stress- Activated Protein Kinases**, v. 20, p. 99–128, 2008.

DOLCET, X.; LLOBET, D.; PALLARES, J.; MATIAS-GUIU, X. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Arch**, v. 446, p. 475–482, 2005.

DONNELLY, R.P.; DICKENSHEETS, H.; FINBLOOM, D.S. The Interleukin-10 Signal Transduction Pathway and Regulation of Gene Expression in Mononuclear Phagocytes. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v.19, n.6, p.563-573, 1999.

ENSLEN, H.; RAINGEAUD, J.; DAVIS, R.J. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. **J Biol Chem**. v.273, p.1741-8, 1998.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. **Cell**, v. 61, p. 759-767, 1990.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; VIANA, M.P.; SOUZA, T.M.; VASCONCELOS, I.M.; SOARES, B.M. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Annals of the Brazilian Academy of Science**, v.83, p. 1045-1058, 2011.

FERREIRA, L.C.; GRABE-GUIMARÃES, A.; DE PAULA, C.A.; MICHEL, M.C.; GUIMARÃES, R.G.; REZENDE, S.A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **J Ethnopharmacol.** v.9, n.145(1), p.100-8, 2013.

FOO, S.Y.; NOLAN, G.P. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. **Trends Genet.** v.15,p.229-235, 1999.

FLORES, G.; DASTMALCHI, K.; WU, S.B.; WHALEN, K.; DABO, A.J.; REYNERTSON, K.A. et al. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food chemistry**, v.141, n.2, p.889-895, 2013.

FLOSSMANN, E.; ROTHWELL, P.M. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. **Lancet**, v. 369, p. 1603–13, 2007.

GALON, J.; COSTES, A.; SANCHEZ-CABO, F.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; LAGORCE-PAGÈS, C.; et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, v. 313, p. 1960-4, 2006.

GARCIA, J., LEMERCIER, B., ROMAN-ROMAN, S.,RAWADI, G. A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 andNF- κ B activity and cytokine secretion inmacrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 273, n. 51, p. 34391–34398, 1998.

GARCÍA-PÉREZ, M.E., ALLAEYS, I., RUSU, D., POULIOT, R., JANEZIC, T.S., POUBELLE, P.E. Picea mariana polyphenolic extract inhibits proinflammatory mediators produced by TNF- α -activated psoriatic keratinocytes: Impact on NF- κ B pathway. **J Ethnopharmacol.** v. 151, n.1, p. 265-78, 2014.

GARG, A.; AGGARWAL, B.B. Nuclear transcription factor-KB as a target for cancer drug development. **Leukemia**, v. 16, p. 1053–1068, 2002.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v. 43, p. 374-379, 2008.

GHATAN, S.; LARNER, S.; KINOSHITA, Y.; HETMAN, M.; PATEL, L.; XIA, Z.; YOUNG, R.J.; MORRISON, R.S. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. **J Cell Biol.** v.24, n.150(2), p.335-47, 2000.

GRETEN, F.R.; ECKMANN, L.; GRETEN, T.F.; PARK, J.M.; LI, Z.W.; EGAN, L.J.; KAGNOFF, M.F.; KARIN, M. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell**, v. 118, p. 285-96, 2004.

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

HANÁKOVÁ, Z.; HOŠEK, J.; BABULA, P.; DALL'ACQUA, S.; VÁCLAVÍK, J.; ŠMEJKAL, K. C-Geranylated Flavanones from Paulownia tomentosa Fruits as Potential Anti-inflammatory Compounds Acting via Inhibition of TNF- α Production. **J. Nat Prod.** v.24 n.78, p.850-63, 2015.

HAQ, R.; BRENTON, J.D.; TAKAHASHI, M.; FINAN, D.; FINKIELSZTEIN, A.; DAMARAJU, S.; et al. Constitutive p38^{HOG} mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. **Cancer Res.** v. 62, p. 5076–5082, 2002.

HARRISON, M.L.; OBERMUELLER, E.; MAISEY, N.R.; HOARE, S.; EDMONDS, K.; LI, N.F.; CHAO, D. et al. Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. **J Clin Oncol**, v. 25, p. 4542–9, 2007.

HENRIETTE, G., LORRAINE, L., BETTINA, H., CLEMENCE, D., DONG, K., IRENEJ, K., et al. Antivascular and antitumor evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-3-cyano-4H-chromenes, a novel series of anticancer agents. **Mol Cancer Ther.** v. 3, n.11, p.1375-84, 2004.

HERATH, T.D.; DARVEAU, R.P.; SENEVIRATNE, C.J.; WANG, C.Y.; WANG, Y.; JIN, L. Tetra- and penta-acylated lipid A structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF- κ B signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts. **PLoS One**. v.8, n.3, 2013.

HÉRON-MILHAVET, L.; LEROITH, D. Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. **J Biol Chem**. v.3, n.277, p.15600-6, 2002.

HIGUCHI, R., C. FOCKLER, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**. v. 11, n.9, p. 1026-30, 1993.

HOFFMANN, A.; NATOLI, G.; GHOSH, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. **Oncogene**, v. 25, p. 67-76, 2006.

HORIE, K.; OHASHI, M.; SATOH, Y.; SAIRENJI, T. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in regulating interleukin-10 gene expression in Burkitt's lymphoma cell lines. **Microbiol Immunol**. v.51, n.1, p.149-61, 2007.

HU, M.C.; WANG, Y.P.; MIKHAIL, A.; QIU, W.R.; TAN, T.H. Murine p38- delta mitogen activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase

that is activated by stress and proinflammatory cytokines. **J Biol Chem.** v.274, p.7095-102, 1999.

HUI, L.; BAKIRI, L.; STEPNIAK, E.; WAGNER, E. F. p38 α : a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2429–2433, 2007.

JACINTO, E.; LOEWITH, R.; SCHMIDT, A.; LIN, S.; RUEGG, M. A.; HALL, A.; HALL, M. N. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nature Cell Biol.** v.6, p.1122-1128, 2004.

JANG, K.J.; HAN, M.H.; LEE, B.H.; KIM, B.W.; KIM, C.H.; YOON, H.M.; CHOI, Y.H. Induction of apoptosis by ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* in human gastric carcinoma cells. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 3, p. 24–31, 2010.

JANICKE, R.U.; SOHN, D.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. **Cell Death Differ.** v.15, p.959-976, 2008.

JEONG, D.; YANG, W.S.; YANG, Y.; NAM, G.; KIM, J.H.; YOON, D.H. et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effect of *Rhodomyrtus tomentosa* methanol extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.146, n.1, p. 205-13, 2013.

JORGE, L.I.F; AGUIAR, J.P.L.; SILVA, M.L.P. Anatomia foliar de pedrahume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia* – Myrtaceae). **Acta Amazonica**, v.30, n.1, p. 49-57, 2000.

KARIN, M. Tracking the road from inflammation to cancer: the critical role of IkappaB kinase (IKK). **Harvey Lectures**, v. 102, p. 133-151, 2006.

KARIN, M., GALLAGHER, E. From JNK to pay dirt: Jun Kinases, their Biochemistry, Physiology and Clinical Importance. **IUBMB Life.** v. 57, p. 283-295, 2005.

KEFALOYIANNI, E.; GAITANAKI, C.; BEIS, I. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF- κ B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. **Cell Signalling**, v. 18, p. 2238–2251, 2006.

KIM, K.H.; PARK, J.K.; CHOI, Y.W.; LEE, J.R.; KIM, H.S.; BAEK, S.Y.; et al. Hexane extract of aged black garlic reduces cell proliferation and attenuates the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in TNF- α -Activated human endometrial stromal cells. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 32, p. 67-78, 2013.

KLAMPFER, L. Cytokines, inflammation and colon cancer. **Curr Cancer Drug Targets**. v.11, n.4, p.451-64, 2011.

KOEHN, C.H.; DUBOIS, R.N. COX-2 inhibition and colorectal cancer. **Semin Oncol**, v. 31, p. 12–21, 2004.

KULBE, H.; THOMPSON, R.; WILSON, J.L.; ROBINSON, S.; HAGEMANN, T.; FATAH, R.; GOULD, D.; AYHAN, A.; BALKWILL, F. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. **Cancer Res**, v. 67, p. 585–92, 2007.

KULBE, H.; HAGEMANN, T.; SZLOSAREK, P.W.; BALKWILL, F.R.; WILSON, J.L. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. **Cancer Res**, v. 65, p. 10355–62, 2005.

KUMMER, J.L.; RAO, P.K.; HEIDENREICH, K.A. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogenactivated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 272, p. 20490–20494, 1997.

KUPER, H.; ADAMI, H.O.; TRICHOPOULOS, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. **J Intern Med**. v. 248, p. 171-83, 2000.

KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. Mmmalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol Rev.** v. 81, n. 2, p. 807-69, 2001.

LAGO, J.H.G.; SOUZA, E.D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M.A.; MARTINS, R.C.C.; et al. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils for Two Species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O.BERG) Kausel. **Molecules**, v. 16, p. 9827-9837, 2011.

LE-NICULESCU, H.; BONFOCO, E.; KASUYA, Y.; CLARET, F.X.; GREEN, D.R.; KARIN, M. Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. **Mol Cell Biol.** v.19, n.1, p.751-63, 1999.

LEE, H.; LEE, J.H.; JUNG, K.H.; HONG, S.S. Deguelin promotes apoptosis and inhibits angiogenesis of gastric cancer. **Oncol Rep**, v. 24, p. 957–963, 2010.

LI, L.J.; YU, L.J.; LI, Y.C.; LIU, M.Y.; WU, Z.Z. In vitro anti-inflammatory and free radical scavenging activities of flavans from *Ilex centrochinensis*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.** v.40, n.8, p.1523-8, 2015.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kB regularion in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n.10, p. 725-734, 2002.

LIMBERGER, R. P.; SIMÕES-PIRES, C. A.; SOBRAL, M.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; HENRIQUES, A. T. Essential oils from *Calyptanthus concinna*, *C. lucida* and *C. rubella* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n.3, p. 355-360, 2002.

LIN, A.; KARIN, M. NF-kappaB in cancer: a marked target. **Semin Cancer Biol**, v.13, p. 107–114, 2003.

LIN, W.W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest.** v.117, n.5, p.1175-83, 2007.

LIU, H.; SCHMITZ, J.C.; WEI, J.; CAO, S.; BEUMER, J.H.; STRYCHOR, S. et al. Clove extract inhibits tumor growth and promotes cell cycle arrest and apoptosis. **Oncology research**, v.21, n.5, p.247, 2014.

LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487–501, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. **Nova Instituto Plantarum**: Odessa, São Paulo, Brazil, 2002

MABBERLY, D.J. The Plant Book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants. **Cambridge University Press**: Cambridge, UK, ed. 2, 1997.

MACKAY, K.; MOCHLY-ROSEN, D. An inhibitor of p38 mitogenactivated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. **J Biol Chem**. v.5, n.274(10), p.6272-9, 1999.

MADHUSUDAN, S.; MUTHURAMALINGAM, S.R.; BRAYBROOKE, J.P.; WILNER, S.; KAUR, K.; HAN, C.; HOARE, S.; BALKWILL, F.; GANESAN, T.S. Study of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, in recurrent ovarian cancer. **J Clin Oncol**, v. 23 p. 5950–9, 2005.

MAGNOTTA, M., MURATA, J., CHEN, J., DE LUCA, V. Identification of a low vindoline accumulating cultivar of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don by alkaloid and enzymatic profiling. **Phytochemistry**. v. 67, p. 1758–1764, 2006.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Plantas Aromáticas na Amazônia e Seus Óleos Essenciais. **Museu Paraense Emílio Goeldi** (Série Adolpho Ducke): Belém, 2001.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, p. 436–44, 2008.

MARTIN, A.G.; TRAMA, J.; CRIGHTON, D.; RYAN, K.M.; FEARNHEAD, H.O. Activation of p73 and induction of Noxa by DNA damage requires NF-kappa B **Aging**. v.1, n.3, p.335–349, 2009.

MAY, M.J.; GHOSH, S. Signal transduction through NF-kappa B. **Immunol Today**, v. 19, p. 80–88, 1998.

MCKAY, L.I.; CIDLOWSKI, J.A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways. **Endoc Rev**, v. 20, n. 4, p. 435-59, 1999.

MELINO, G.; DE LAURENZI, V.; VOUSDEN, K.H. p73: Friend or foe in tumorigenesis. **Nat Rev Cancer**. v.2, p.605-615, 2002.

MICHEL, M.C.P.; GUIMARÃES, A.G.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; SOBRAL, M.E.G.; GUIMARÃES, D.A.S. Extracts from the leaves of *Campomanesia velutina* inhibits production of LPS/INF- γ induced inflammatory mediators in J774A.1 cells and exerts anti-inflammatory and antinociceptive effects in vivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, n.6, p.927-936, 2013.

MILAN, M., MIRJANA, M., DESANKA, B., SANJA, M., NEDA, N., VLADIMIR, M., et al. In vitro antioxidant of selected 4-Hydroxy-chromene-2-one derivatives-SAR, QSAR and DFT studies. **Int J Mol Sci**. v. 12, n.5, p. 2822-41, 2011.

MITTELSTADT, P. R.; SALVADOR, J. M.; FORNACE, A. J. JR.; ASHWELL, J. D. Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. **Cell Cycle**, v. 4, p. 1189–1192, 2005.

MULLER, U.; JONGENEEL, C.V.; NEDOSPASOV, S.A.; LINDAHL, K.F.; STEINMETZ, M. Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. **Nature**, v. 325, p. 265–267, 1987.

NATOLI, G.; COSTANZO, A.; IANNI, A.; TEMPLETON, D.J.; WOODGETT, J.R.; BALSANO, C.; LEVRERO, M. Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. **Cell Signal**, v. 275, p. 200–203, 1997.

NEBREDA, A.R., PORRAS, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. **Trans Biochem Sci**. v. 25, n. 6, p. 257-60, 2000.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep.**, v. 17, p. 215-234, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OKAMOTO, S.; KRAINIC, D.; SHERMAN, K.; LIPTON, S.A. Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.20, n.97, p.7561-6, 2000.

OLD, L.J. Tumor necrosis factor (TNF). **Science**, v. 230, p. 630–632, 1985.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, **OMIM**[®]. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>>. Acesso em: 03 de setembro de 2014.

ONO, K.; HAN, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. **Cell Signal**, v. 12, p. 1–13, 2000.

PAN, M.H.; CHAI, G.; HO, C.T. Food bioactives, apoptosis, and cancer. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, p. 43-52, 2008.

PARK, J.M.; GRETEN, F.R.; LI, Z.W.; KARIN, M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. **Science**. v. 20, n.297, p.2048-51, 2002.

PARK, S.H., KOO, H.J., SUNG, Y.Y., KIM, H.K. The protective effect of *Prunella vulgaris* ethanol extract against vascularinflammation in TNF- α -stimulated human aortic smooth muscle cells. **BMB Rep.** v. 46, n. 7, p. 352-7, 2013.

PASCOAL, A.C.R.F.; EHRENFRIED, C.A.; LOPEZ, B.G.C.; ARAUJO T.M.; PASCOAL V.D.B.; GILIOLI, R.; et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis IN pc-3 cells by the Chalcone Cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a Bioactivity-Guided Study. **Molecules**, v. 19 p.1843-1855, 2014.

PERKINS, N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.8, n.1, p.49-62, 2007.

PERKINS, N.D.; GILMORE, T.D. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. **Cell Death Differ.** v.13, p.759-772, 2006.

PIKARSKY, E.; PORAT, R.M.; STEIN, I.; ABRAMOVITCH, R.; AMIT, S.; KASEM, S.; et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature.** v.23, n.431, p.461-6, 2004.

PORRAS, A. GUERRERO, C. Role of p38 α in apoptosis: implication in cancer development and therapy. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.** v.15, n.3, 2011.

PORRAS, A.; ZULUAGA, S.; BLACK, E.; VALLADARES, A.; ALVAREZ, A.M.; AMBROSINO, C. et al. P38 alpha mitogenactivated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. **Mol Biol Cell.** v.15, n.2, p.922-33, 2004.

PURI, P.L.; WU, Z.; ZHANG, P.; WOOD, L.D.; BHAKTA, K.S.; HAN, J.; FERAMISCO, J.R.; KARIN, M.; WANG, J.Y. Induction of terminal

differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. **Genes Dev.** v.; 14, p. 574–584, 2000.

RASUL, A.; YU, B.; ZHONG, L.; KHAN, M.; YANG, H.; MA, T. Cytotoxic effect of evodiamine in SGC-7901 human gastric adenocarcinoma cells via simultaneous induction of apoptosis and autophagy. **Oncol Rep**, v. 27, p. 1481–1487, 2012.

RASUL, A.; YU, B.; YANG, L.F.; ALI, M.; KHAN, M.; MA, T.; YANG, H. Induction of mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells by kuraridin and Nor-kuraridinone isolated from *Sophora flavescens*. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, p. 2499–2504, 2011.

RATH, P.C.; AGGARWAL, B.B. TNF-induced signaling in apoptosis. **J Clin Immunol**, v. 19, p. 350–364, 1999.

RAYET, B.; GELINAS, C. Aberrant *rel/nfkb* genes and activity in human cancer. **Oncogene**, v. 18, p. 6938–6947, 1999.

REN, Q., SIAU, W.Y., DU, Z., ZHANG, K., WANG, J. Expeditious assembly of a 2-Amino-4H-chromene skeleton by using an enantioselective mannich intramolecular ring cyclization–tautomerization cascade sequence. **Chem Eur J**, v. 17, p. 7781–7785, 2011.

RINCÓN, M., DAVIS, R.J. Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. **Immunological Reviews**, v. 228, n. 1, p. 212–224, 2009.

RIZZO, L.Y.; LONGATO, G.B.; RUIZ, A.L.; TINTI, S.V.; POSSENTI, A.; VENDRAMINI-COSTA, D.B. et al. In Vitro, In Vivo and In Silico Analysis of the Anticancer and Estrogen-like Activity of Guava Leaf Extracts. **Current medicinal chemistry**, v.21, n.20, p.2322–2330, 2014.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. **Methods Mol Biol**, v. 132, p. 365–86, 2000.

RYAN, K.M., ERNST, M.K., RICE, N.R., VOUSDEN, K.H. Role of NF-kappa-B in p53-mediated programmed cell death. **Nature**, v. 404, p. 892-897, 2000.

RYAN, K.M.; O'PREY, J.; VOUSDEN, K.H. Loss of nuclear factor-kappaB is tumor promoting but does not substitute for loss of p53. **Cancer Res.** v.64, p.4415-4418, 2004.

SACCANI, S.; PANTANO, S.; NATOLI, G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment. **Nat Immunol**, v. 3, p. 69–75, 2002.

SALEH, A.M.; ALJADA, A.; RIZVI, S.A.A.; NASR, A.;ALASKAR, A.S.; WILLIAMS, J.D. In vitro cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oil is mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.14, p.226, 2014.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N.; SILVEIRA, E.R. Anti-inflammatory and analgesic activities of the essential oil of *Psidium guianense*. **Fitoterapia**, v.68, n.1, p.65-68,1997b.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**. v.10, n.3, p.170-81, 2010.

SAURIN, A.T.; MARTIN, J.L.; HEADS, R.J.; FOLEY, C.; MOCKRIDGE, J.W.; WRIGHT, M.J.; WANG, Y.; MARBER, M.S. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. **FASEB J**. v.14, n.14, p.2237-46, 2000.

SCHEWE, D.M.; AGUIRRE-GHISO, J.A. ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.29, n.105, p.10519-24, 2008.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, p. 705–716, 1986.

SEBOLT-LEOPOLD, J. S.; HERRERA, R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. **Nature Rev Cancer**, v. 4, p. 937–947, 2004.

SERAFINO, A.; SINIBALDI, V.P.; ANDREOLA, F.; ZONFRILLO, M.; MERCURI, L.; FEDERICI, M. et al. Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. **BMC Immunology**, v.9, 2008.

SHARMA, R.; KISHORE, N.; HUSSEIN, A.; LALL, N. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L.(Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. **BMC complementary and alternative medicine**, v.13, n.1, p.292, 2013.

SHE, Q.B.; BODE, A.M.; MA, W.Y.; CHEN, N.Y.; DONG, Z. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular signal-regulated protein kinases and p38 kinase. **Cancer Res**, v. 61, p. 1604–1610, 2001.

SHE, Q.B.; MA, W.Y.; DONG, Z. Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. **Oncogene**. v.21, n.10, p.1580–89, 2002.

SHIMIZU, H.; BABA, N.; NOSE, T.; TAGUCHI, R.; TANAKA, S.; JOE, G.H.; et al. Activity of ERK regulates mucin 3 expression and is involved in undifferentiated Caco-2 cell death induced by 3-oxo-C₁₂-homoserine lactone. **Biosci Biotechnol Biochem**. v.79, n.6, p.937-42, 2015.

SHIMIZU, H.; BABA, N.; NOSE, T.; TAGUCHI, R.; TANAKA, S.; JOE, G. Activity of ERK regulates mucin 3 expression and is involved in undifferentiated Caco-2 cell death induced by 3-oxo-C₁₂-homoserine lactone. **Biochemistry & Molecular Biology**. v.79, n.6, p. 937-42, 2015.

SILVA, M.L.; LUZ, A.I.R.; ZOGHBI, M.G.B.; RAMOS, L.S.; MAIA, J.G.S. **Phytochemistry**. v.23, p. 2515, 1984.

SKOOG, T.; VAN'T HOOFT, F. M.; KALLIN, B.; JOVINGE, S.; BOQUIST, S.; NILSSON, J.; ERIKSSON, P.; HAMSTEN, A. A common functional polymorphism (C-A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. **Hum Molec Genet**, v. 8, p. 1443-1449, 1999.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J.A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J.; RODRIGUES, R.S. Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. **São Carlos, RiMA/Novo Ambiente**, 2006.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) leaves. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 20, p. 48-53, 2010.

STEFANELLO, M.E.A.; PASCOAL, A.C.R.F.; SALVADOR, M.J. Essential oils from neo-tropical myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chem Biodivers**. v. 8, p. 73–94, 2011.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Curr Protoc Immunol**. 2001.

STROH, C.; HELD, J.; SAMRAJ, A.K.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Specific inhibition of transcription factor NF- κ B through intracellular protein delivery of I κ B α by the Herpes virus protein VP22. **Oncogene**, v. 22, p. 5367–5373, 2003.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**, v.6. p. 71–133, 1990.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; MUSHTAQ, M.; ASLAM, M.; IJAZ, S. In vitro antimutagenic, antioxidant activities and total phenolics of clove (*Syzygium aromaticum* L.) seed extracts. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v.27, n.4, p.893-899, 2014.

SURESH, T., ARUNIMA, V., ATIN, K., SANDEEP, G., PRARTHANA, V.R., GANESH, R.K. Novel chromeneimidazole derivatives as antifungal compounds: synthesis and in vitro evaluation. **Acta Pol Pharm**. v. 67, p. 423-427, 2010.

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat Rev Cancer**, v. 3, p. 768-780, 2003.

TAHIR, A.A.; SANI, N.F.A.; MURAD, N.A.; MAKPOL, S., NGAH, W.Z.W.; YUSOF, Y.A.M. Combined ginger extract & Gelam honey modulate Ras/ERK and PI3K/AKT pathway genes in colon cancer HT29 cells. **Nutrition Journal**, 2015.

TARTAGLIA, L.A.; GOEDDEL, D.V. Two TNF receptors. **Immunol Today**, v. 13, p. 151–153, 1992.

TASSINARY, J.A.; LUNARDELLI, A.; BASSO, B.S.; STULP, S.; POZZOBON, A.; PEDRAZZA, L. Therapeutic Ultrasound Stimulates MC3T3-E1 Cell Proliferation Through the activation of NF κ B1, p38 α and mTOR. *Lasers IN surgery AND medicine*. v.28, p.1-7, 2015.

THICHANPIANG, P.; WONGPRASERT, K. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate attenuates TNF- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to retinal pigment epithelial cells. *Am J Chin Med*. v.43, n.1, p.103-19, 2015.

THOREEN, C.C.; CHANTRANUPONG, L.; KEYS, H.R.; WANG, T.; GRAY, N.S.; SABATINI, D.M. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. **Nature**. v.485, p.109-113, 2012.

TIMOFEEV, O.; LEE, T.Y.; BULAVIN, D.V. A subtle change in p38 MAPK activity is sufficient to suppress in vivo tumorigenesis. **Cell Cycle**, v. 4, p. 118–120, 2005.

TOLBA, M.F.; ABDEL-RAHMAN, S.Z. Pterostilbine, an active component of blueberries, sensitizes colon cancer cells to 5-fluorouracil cytotoxicity. **Scientific Reports**, v. 5, 2015

TRAINER, D.L.; KLINE, T.; MCCABE, F.L.; FAUCETTE, L.F.; FEILD, J.; CHAIKIN, M.; ANZANO, M.; RIEMAN, D.; HOFFSTEIN, S.; LI, D.J.; et al. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. **Int J Cancer**, v.15, n 41(2), p. 287-96, 1988.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annu Rev Immunol**. v.27, p.693-733, 2009.

VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W.; BEYAERT, R.; FIERIS, W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. **Trends Cell Biol**, v. 5, p. 392–399, 1995.

VERMEULEN, L.; DE WILDE, G.; VAN DAMME, P.; VANDEN BERGHE, W.; HAEGEMAN, G. Transcriptional activation of the NF- κ B p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). **EMBO J**, v. 22, p. 1313–1324, 2003.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim Nova**. v. 29, n.2, p. 326-337, 2006.

VOUSDEN, K.H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nature Reviews Cancer**. v.2, p.594-604, 2002.

WAGNER, E.F.; NEBRED, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 537-49, 2009.

WANG, H.K. Plant-derived anticancer agents currently in clinical use or in clinical trials. **IDrugs**. v. 1, n. 1, p. 92-102, 1998a.

WANG, W.; CHEN, J.X.; LIAO, R.; DENG, Q.; ZHOU, J.J.; HUANG, S.; SUN, P. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. **Mol Cell Biol**. v. 22, p. 3389–3403, 2002.

WANG, W.S.; CHEN, P.M.; WANG, H.S.; LIANG, W.Y.; SU, Y. Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma. **Carcinogenesis**. v. 27, p. 1113-20, 2006.

WANG, W.; XIA, T.; YU, X. Wogonin suppresses inflammatory response and maintains intestinal barrier function via TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF- κ B pathway in vitro. **Inflamm Res**. v.64, n.6, p.423-31, 2015.

WANG, Y.; HUANG, S.; SAH, V.P.; ROSS, J. JR.; BROWN, J.H.; HAN, J.; CHIEN, K.R. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. **J Biol Chem**. v.23, n.273(4), p.2161-8, 1998b.

WEBER, D.M.; CHEN, C.; NIESVIZKY, R.; WANG, M.; BELCH, A.; STADTMAUER, E.A.; et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. **N Engl J Med**, v. 357, p. 2133–42, 2007.

WESTON, C.R., DAVIS, R.J. The JNK signal transduction pathway. **Curr Opin Cell Biol**. v. 19, n. 2, p. 142-9, 2007.

WOLSKA, A.; LECH-MARANDA, E.; ROBAK, T. Toll-like receptors and their role in hematologic malignancies. **Curr Mol Med**. v.9, n.3, p.324-35, 2009.

YANG, W. S., PARK Y. C., KIM J. H., KIM, H.R., YU, T., BYEON,S.E., et al. Nanostructured, selfassembling peptide K5 blocks TNF- and PGE 2 production by suppression of the AP-1/p38 pathway. **Mediators of Inflammation**. v. 2012, 2012.

YANG, W. S., JEONG, D., NAM, G.AL., YI, Y.S., YOON, D.H., KIM, T.W., et al. AP-1 pathway-targeted inhibition of inflammatory responses in LPS-treated macrophages and EtOH/HCl-treated stomach by Archidendron clypearia methanol extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 146, n. 2, p. 637–644, 2013.

YANG, Y., KIM, S. C., YU, T. YI, Y.S., RHEE, M.H., SUNG, G.H., YOO, B.C. CHO, J.Y. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. **Mediators of Inflammation**. v. 2014, 2014.

YE, C.L.; LIU, Y.; WEI, D.Z. Antioxidant and anticancer activity of 3'-formyl-4', 6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone and (2S)-8-formyl-5-hydroxy-7-methoxy-6-methylflavanone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, p.553–559, 2007.

YOON, K.A.; PARK, S.; LEE S.H.; KIM, J.H.; LEE, J.S. Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. **J Mol Diagn**. v. 11, p. 182–185, 2009.

YU, T., SHIM, J., YANG, Y., BYEON, S.E., KIM, J.H., RHO, H.S., et al. 3-(4-(tert Octyl)phenoxy)propane-1,2-diol suppresses inflammatory responses via inhibition of multiple kinases. **Biochemical Pharmacology**. v. 83, n. 11, p. 1540–1551, 2012.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Research**. v.15, n.1, p.11-18, 2005.

ZHANG, P.; ZHANG, E.; XIAO, M.; CHEN, C.; XU, W. Enhanced chemical and biological activities of a newly biosynthesized eugenol glycoconjugate, eugenol α -d-glucopyranoside. **Applied microbiology and biotechnology**, v.97, n.3, p.1043-1050, 2013

ZHANG, X.; SHAN, P.; ALAM, J.; DAVIS, R.J.; FLAVELL, R.A.; LEE, P.J. Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. **J Biol Chem**. v.13, n.278, p.22061-70, 2003.

ZHAOWEI, Z.; ZHONG, S.; SHEN, Z. Targeting the inflammatory pathways to enhance chemotherapy of cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 12, n. 2, p. 95-105, 2011.

ZHU, Z.; ZHOUJUN, S.; XU, C. Inflammatory pathways as promising targets to increase chemotherapy response in bladder cancer. **Mediators of Inflammation**. v. 2012, 2012.

ZULUAGA, S.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; GUTIÉRREZ-UZQUIZA, A.; BENITO, M.; NEBRED, A.R.; PORRAS, A. Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. **Cell Signal**. v.19, n.1, p.62-74, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Representação das reações de qPCR em tempo real

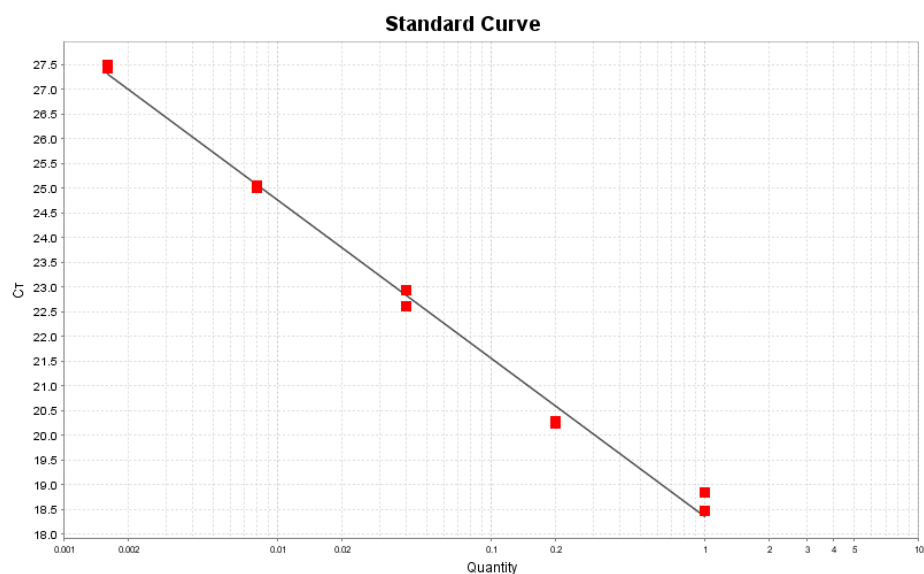


FIGURA 13 - Curva padrão para o gene *ACTB*. A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de células Caco-2. De 1,0 a 0,0054 ng de DNAc. $R^2 = 0.994$, Eff%: 105.293.

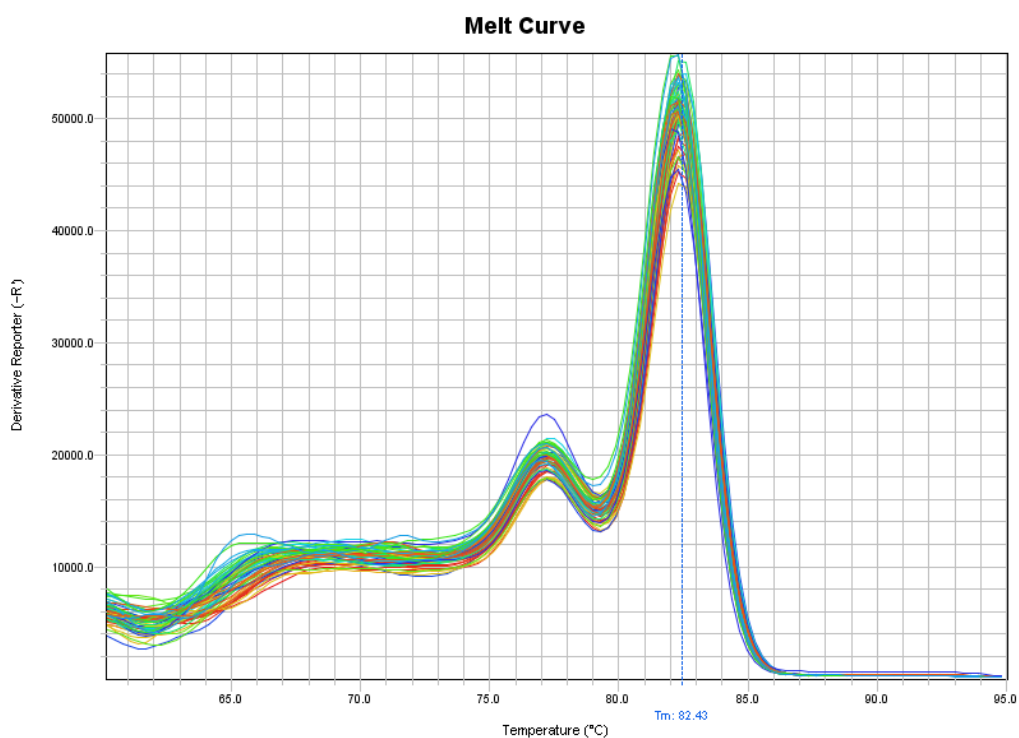


FIGURA 14 - Curva de *melting* para o gene *ACTB*. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 82.43 °C corresponde ao produto de 140 pb do gene *ACTB*.

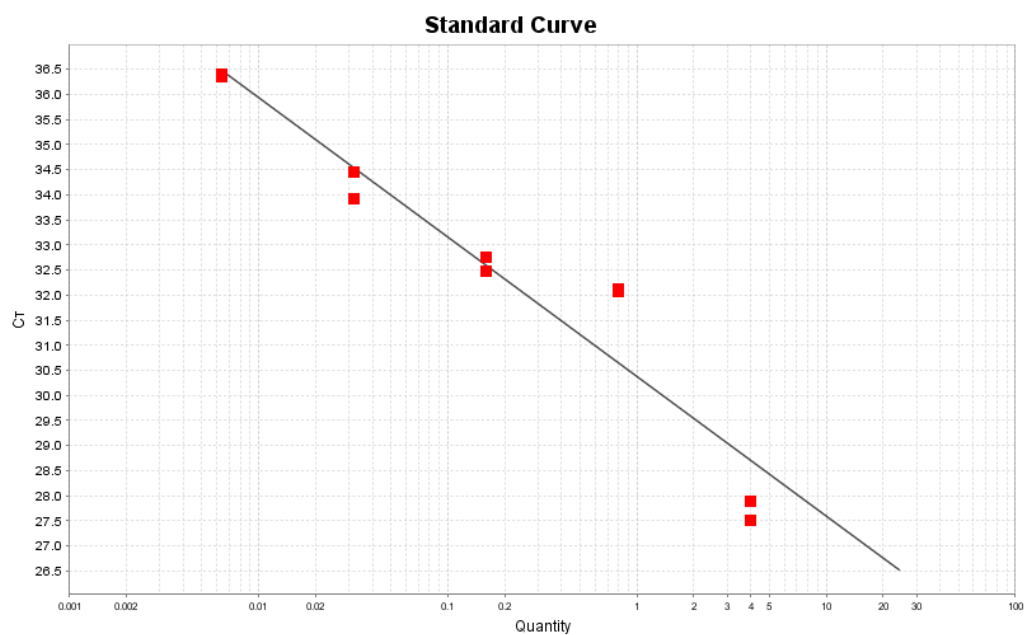


FIGURA 15 - Curva padrão para o gene *TNF- α* . A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de células Caco-2. De 1,0 a 0,0054 ng de DNAc. $R^2 = 0.919$, Eff%: 128.649

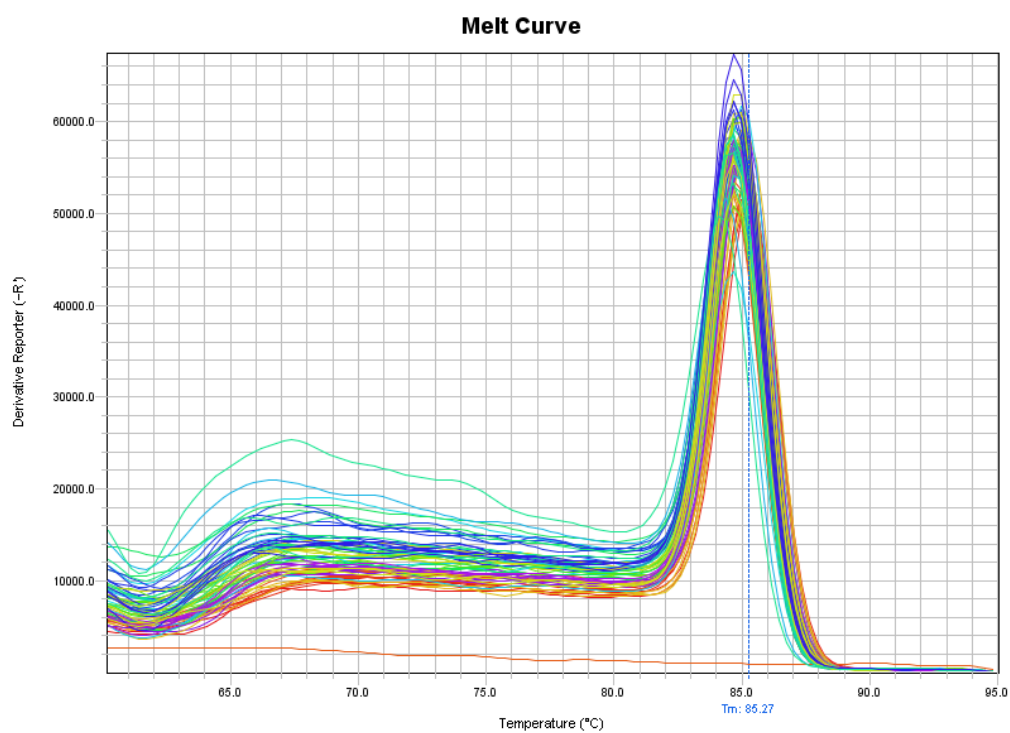


FIGURA 16 - Curva de *melting* para o gene *TNF- α* . A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na T_m de 85.27 °C corresponde ao produto de 120 pb do gene *TNF- α* .

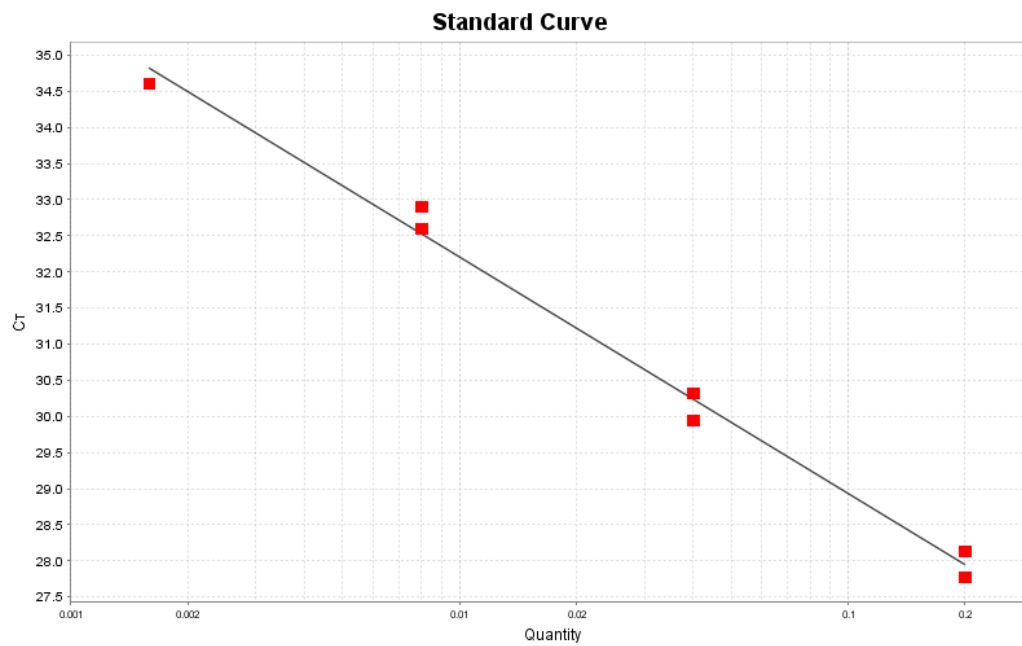


FIGURA 17 - Curva padrão para o gene *p38α*. A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de células Caco-2. De 1,0 a 0,0054 ng de DNAc. $R^2 = 0.991$, Eff%: 101.97

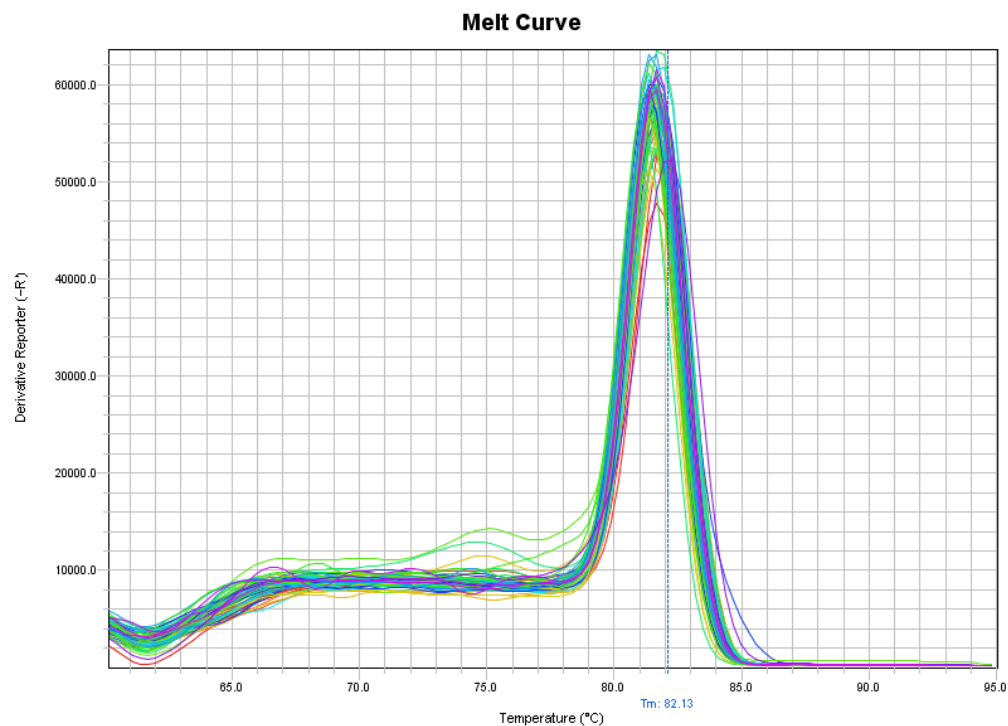


FIGURA 18 - Curva de *melting* para o gene *p38α*. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 82.13°C corresponde ao produto de 243 pb do gene *p38α*.

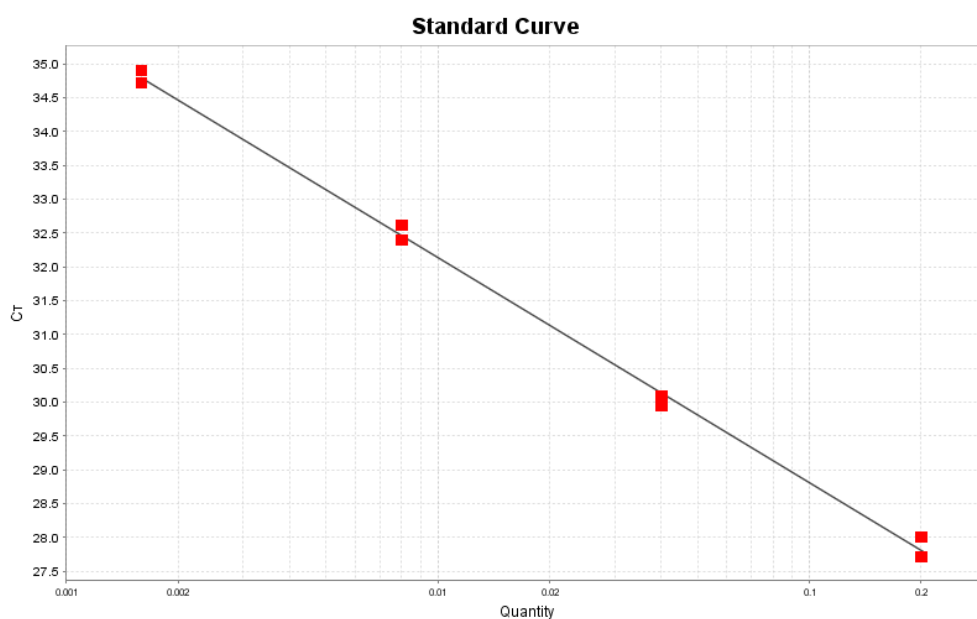


FIGURA 19 - Curva padrão para o gene *NF-κB*. A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de células Caco-2. De 1,0 a 0,0054 ng de DNAc. $R^2 = 0.998$, Eff%: 99.309.

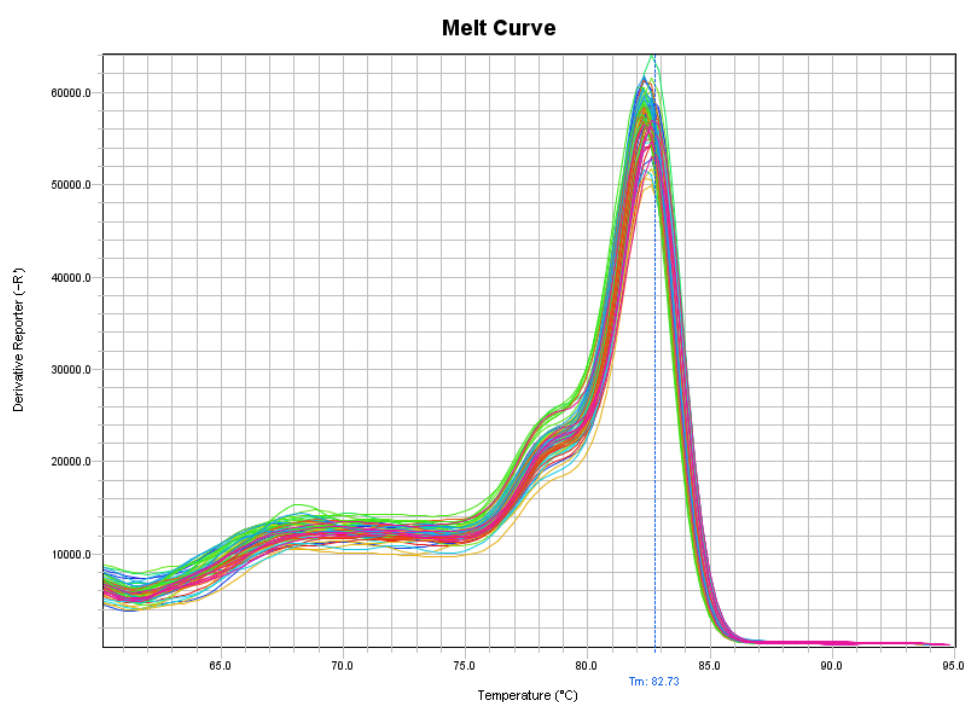


FIGURA 20 - Curva de *melting* para o gene *NF-κB*. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na T_m de 82.73°C corresponde ao produto de 209 pb do gene do *NF-κB*.