

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS E  
OBESIDADE

**Danielle Cristina Zimmermann Franco**

**INVESTIGAÇÃO DOS POTENCIAIS ANTI-INFLAMATÓRIO E  
ANTITUMORAL DE ANÁLOGOS DO RESVERATROL**

Juiz de Fora  
2017

**DANIELLE CRISTINA ZIMMERMANN FRANCO**

**INVESTIGAÇÃO DOS POTENCIAIS ANTI-INFLAMATÓRIO E  
ANTITUMORAL DE ANÁLOGOS DO RESVERATROL**

Tese de Doutorado do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Costa Macedo**

Juiz de Fora  
2017

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

Zimmermann Franco, Danielle Cristina.

INVESTIGAÇÃO DOS POTENCIAIS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTITUMORAL DE ANÁLOGOS DO RESVERATROL / Danielle Cristina Zimmermann Franco. -- 2017.

165 p.

Orientador: Gilson Costa Macedo

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

1. Análogos Sintéticos. 2. Anti-inflamatório. 3. Antitumoral. 4. Imunomodulação. 5. Resveratrol. I. Macedo, Gilson Costa, orient. II. Título.

**Danielle Cristina Zimmermann Franco**

**INVESTIGAÇÃO DOS POTENCIAIS ANTI-INFLAMATÓRIO E  
ANTITUMORAL DE ANÁLOGOS DO RESVERATROL**

Tese aprovada em: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira  
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
Universidade Federal de Alfenas

---

Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Junior  
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Paiva Corsetti  
Universidade José do Rosário Vellano

---

Orientador: Prof. Dr. Gilson Costa Macedo  
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho àqueles cuja fé em Deus ajuda a direcionar nosso trabalho em busca da cura de suas doenças.

## AGRADECIMENTOS

Ao longo desta jornada muitas pessoas se fizeram presentes. Algumas, com passagens rápidas; outras, duradouras. Todas dignas de meu muito obrigada por cada colaboração deixada.

A Deus, agradeço pela luz que me guiou para o caminho da minha verdadeira vocação.

Aos meus pais, por sempre me incentivarem e ajudarem com muito orgulho em cada nova etapa de minha vida.

À minha irmã Fernanda, por ser presença constante em minha vida e me ajudar em tudo e a ver a luz nos momentos complicados.

Ao Rodrigo, meu marido, pelo amor e por conviver, muitas vezes, com minhas ausências, ocupações e preocupações em prol de minha realização profissional.

Ao João, por dividir a tela do computador comigo tantas vezes enquanto eu escrevia ou estudava, por gostar dos meus ratinhos e por me incentivar a cada dia a buscar algo melhor em mim e para nós.

Às minhas AMIGAS e maravilhosa equipe de laboratório – A “FAMÍLIA LAB” – Bruna, Ju, Gabi, Lets, Livinha, Marcela, Thay, Dib e Siano. Sem vocês esses quatro anos não deixariam tantas saudades!

A duas pessoas muito especiais e prestativas, Polly e Lúcia, pela presteza, ajuda e bate-papos!

Aos alunos da Bioquímica, Dani, Nicolas, André e Gustavo pela amizade e contribuições.

Aos professores colaboradores deste estudo, em especial Prof. Adilson, pela confiança em ceder seus compostos.

Aos professores do Departamento de Imunologia, Dr. Henrique e Dr.<sup>a</sup> Ana Paula, por compartilharem o IMUNOCET conosco.

Ao meu orientador Gilson, por ter apostado na minha proposta, ter se tornado um bom amigo e por trabalhar com afinco no meu desenvolvimento científico!

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram de alguma maneira para com a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*Há três métodos para ganhar sabedoria:  
primeiro, por reflexão, que é o mais nobre;  
segundo por imitação, que é o mais fácil;  
terceiro, por experiência que é o mais  
amargo.*

Confúcio

## RESUMO

O resveratrol é um polifenol da classe dos estilbenos produzido por inúmeras plantas em resposta ao estresse do ambiente sendo reconhecido por apresentar inúmeras atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antiviral, cardioprotetora, antitumoral, dentre muitas outras. Apesar disso, a reduzida biodisponibilidade do resveratrol tem sido fator limitante para a sua ampla utilização, fomentando a pesquisa por análogos quimicamente modificados que tenham suas atividades potencializadas e biodisponibilidade melhorada. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os potenciais anti-inflamatório e antitumoral de compostos análogos do resveratrol. Foram avaliados quinze análogos quanto às suas propriedades físico-químicas e interferência na viabilidade de células RAW 264.7 e de células tumorais da linhagem 4T1 (método de MTT). Os oito análogos com melhor resposta aos ensaios anteriores foram selecionados e testados sobre outra linhagem celular (J774.A1) e cultura primária de macrófagos peritoneais, confirmando sua inocuidade às mesmas. A  $LC_{50}$  sobre células RAW 264.7 também foi determinada. Em seguida, os análogos foram testados quanto ao potencial antioxidante (ensaio de captura do íon DPPH); influência na produção de óxido nítrico (NO) (reação de Griess), de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e da quimiocina CCL-2 (ambos por Elisa). A atividade imunomoduladora foi determinada por meio da análise da expressão de MHCII e de moléculas costimuladoras CD80, CD86 e CTLA-4 (citometria de fluxo), além da influência na proliferação de linfócitos T e B (método de MTT). A partir destes dados, quatro análogos foram selecionados e avaliados *in vivo* pelo modelo de edema de orelha murino, revelando resultados satisfatórios para todos os análogos. No entanto, dois deles se sobressaíram e foram empregados em um modelo de artrite induzida por zymosan, confirmando que os mesmos são capazes de fornecer resultados comparáveis à dexametasona. Quanto ao potencial antitumoral, foi determinado a  $LC_{50}$  e índice de seletividade (IS) dos análogos frente a linhagens celulares de câncer de mama humano (MCF-7) e murino (4T1) e melanoma murino (B16). Os resultados obtidos revelaram que pelo menos cinco análogos podem ser explorados neste sentido, apresentando IS comparável ou superior ao de fármacos classicamente utilizados na terapia antineoplásica. Mais estudos devem ser conduzidos no intuito de determinar os mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória, a influência da imunomodulação na atividade antitumoral e a biodisponibilidade destes análogos.

**Palavras-chave:** Análogos sintéticos. Anti-inflamatório. Antineoplásico. Imunomodulação. Resveratrol.

## ABSTRACT

Resveratrol is a polyphenolic phytoalexin stilbene produced by many plants in response to hostile environmental conditions, recognized to present innumerable biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antiviral, cardioprotective, antitumor and others. However, the reduced bioavailability of resveratrol has been the limiting factor for its widespread use. Therefore, chemically modified resveratrol analogs that have its activities potentiated, eliminating the problem of bioavailability, are the subject of investigations. Thus, the aim of the present study was to evaluate the anti-inflammatory and antitumor potential of resveratrol analogues. Fifteen analogues were evaluated for physicochemical properties and influence on the viability of RAW 264.7 cells and 4T1 strain tumor cells (MTT method), determining the analogs with highest potential to remain in the study. Thus, the eight selected analogs were tested on another cell line (J774.A1) and a primary culture (peritoneal macrophages), confirming their innocuity to it. These analogs also had LC50 determined on RAW 264.7 cells. Next, it was tested for antioxidant potential (DPPH ion capture assay); evaluated on the influence on the production of nitric oxide (NO) (Griess reaction for nitrite dosing); cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and chemokine (MCP1) (both by Elisa); Expression of MHCII and CD80, CD86 and CTLA-4 (flow cytometry) and proliferation of T and B lymphocytes (MTT method). From these data, four analogs used topically in a model of acute inflammation of ear edema were found, revealing satisfactory results for all analogues. However, two of them excelled and were employed in a Zymosan-induced arthritis model, confirming that they are able to provide results comparable to dexamethasone. As for the direct antitumor potential of synthetic molecules, the LC50 and the selectivity index (SI) against human breast cancer cells (MCF-7) and murine (4T1) and murine melanoma (B16) were determined. The obtained results revealed that at least five analogs can be exploited in this way, presenting comparable or higher SI than drugs classically used in antineoplastic therapy. Further studies shall be conducted in order to determine the mechanisms of action involved in anti-inflammatory activity, the influence of immunomodulation on antitumor activity and the bioavailability of these analogs.

**Keywords:** Antineoplastic. Anti-inflammatory. Immunomodulation. Synthetic analogues. Resveratrol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do resveratrol. ....	19
Figura 2: Estrutura geral das (A) iminas, das (b) hidrazonas (c) e as tioiminas, análogos ao resveratrol. ....	26
Figura 3: O processo inflamatório. ....	43
Figura 4: Etapas da inflamação aguda.....	45
Figura 5: Sinal primário e secundário envolvido na ativação de uma célula T. ....	50
Figura 6: Delineamento experimental com as etapas realizadas para direcionamento dos análogos empregados nos ensaios <i>in vivo</i> .....	56
Figura 7: Administração de Zymosan na região da articulação talocrural e subtalar.	68
Figura 8: Avaliação da influência dos análogos do resveratrol sobre a viabilidade de células RAW 264.7 nas concentrações de 10µM, 25 µM e 50 µM.....	73
Figura 9: Avaliação da influência dos análogos do resveratrol sobre a viabilidade de células J774.A1 na concentração de 50 µM.....	75
Figura 10: Avaliação da influência de análogos do resveratrol sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais na concentração de 50 µM.....	76
Figura 11: Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264.7 pré-estimuladas e tratadas com análogos do resveratrol em diferentes concentrações..	79
Figura 12 : Influência dos análogos do resveratrol na expressão de (A) CD80, (B) CD86 e (C) MHCII por RAW 264.7 estimuladas com LPS.....	82
Figura 13: Influência dos análogos do resveratrol na proliferação de esplenócitos estimulados com (A) Lipopolissacarídeo e (B) Concanavalina A.....	83
Figura 14: Influência dos análogos do resveratrol na expressão de CTLA-4 em linfócitos B (CD19 <sup>+</sup> ) e T (CD3 <sup>+</sup> ) em esplenócitos estimulados com ConA.....	85
Figura 15: Efeito da administração tópica de resveratrol (RVT) e análogos no edema auricular induzido por óleo de cróton.. ....	89
Figura 16: Efeito da administração tópica de resveratrol e análogos no infiltrado inflamatório de camundongos submetidos ao modelo de edema auricular induzido por óleo de cróton.....	90
Figura 17: Efeito da administração tópica dos análogos do resveratrol (RVT), resveratrol e dexametasona (DXT) na inflamação por modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. ....	92

Figura 18: Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal sem inflamação (controle limpo).....	94
Figura 19: Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal com inflamação e tratado com veículo (controle negativo). .....	94
Figura 20: Fotomicrografias demonstrando a morfologia da região articular dos animais dos grupos: A) Veículo (controle negativo); B) AR23; C) AR33; D) Resveratrol (RVT); E) Dexametasona (DXT) (controle positivo) .....	96
Figura 21: Influência dos tratamentos com os análogos e o resveratrol em parâmetros inflamatórios da artrite induzida por Zymosan.....	97
Figura 22: Influência do tratamento com os análogos e resveratrol na artrite induzida por Zymosan. (A) IL-1 $\beta$ ; (B) IL-6; (C) IL-12; (D) TNF- $\alpha$ ; (E) CCL_2; (F) IL-10.....	99
Figura 23: Influência do tratamento com os análogos AR23 e AR33, resveratrol (RVT) e dexametasona (DXT) na proporção do baço pela massa corpórea total. ....	100
Figura 24: Fotografia ilustrativa comparando os baços de camundongos C67BL/6 tratados com os análogos do resveratrol e tratados com dexametasona. ....	101
Figura 25: Avaliação do potencial antitumoral do resveratrol e análogos sobre células 4T1 em diferentes concentrações .....	130
Figura 26: Influência dos análogos do resveratrol em células tumorais de linhagens tumorais: (A) B16.F1 e (B) MCF-7.....	132

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Drogas modificadoras do curso da doença (DMCD), seus principais efeitos adversos e limitações de seu uso. ....	55
Quadro 2: Sumário dos critérios avaliados para atividade anti-inflamatória in vitro e capacidade dos análogos em exercer um efeito anti-inflamatório.....	103
Quadro 3: Principais efeitos adversos relacionados a quimioterapia do câncer..	12238

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análogos do resveratrol utilizados, sua fórmula molecular, massa molar (g.mol <sup>-1</sup> ) e classe química.....	24
Tabela 2: Caracterização dos compostos por ressonância magnética nuclear (RMN), ponto de fusão (PF) e rendimento na produção dos análogos.....	27
Tabela 3: Avaliação de propriedades moleculares físico-químicas dos análogos de acordo com a regra de Lipinski e TPSA.....	29
Tabela 4: Perfil de toxicidade do resveratrol e análogos em células RAW 264.7, expressos em LC <sub>50</sub> (µM).....	74
Tabela 5: Atividade antioxidante expressa em IC <sub>50</sub> (µM) do resveratrol e análogos, pelo método DPPH e coeficiente de relação (r) obtido.....	77
Tabela 6: Influência do resveratrol e análogos (50µM) na produção de e quimiocina em células RAW 264.7 (CCL-2, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF-α), J774.A1 (IL-1β) e esplenócitos (IFN-γ).....	80
Tabela 7: Valores de LC <sub>50</sub> para o resveratrol e análogos frente às linhagens tumorais B16.F1, 4T1 e MCF-7 e linhagem não tumoral RAW 264.7 e índice de seletividade (IS) dos compostos.....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcM	Anticorpo Monoclonal
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
AR	Análogos do Resveratrol
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CD	Células dendríticas
CD	Cluster de diferenciação
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
ConA	Concanavalina-A
COX	Ciclooxigenase
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4</i>
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DMCD	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DXT	Dexametasona
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ECAM	Moléculas de Adesão de Células Endoteliais
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
eNOS	Óxido Nítrico sintase endotelial
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos ou fator de angiogênese
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulocitárias
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulocitárias e Monócitos
HE	Hematoxilina & Eosina
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória para 50%
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido Nítrico sintase induzível
IP	Índice de proliferação
IS	Índice de seletividade
LPS	Lipopolissacarídeo
LB	Linfócito B
LC <sub>50</sub>	Concentração Letal para 50%
LT	Linfócito T
LTC	Linfócito T Citotóxico
MAT	Mácrofago Associado a Tumor
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIF	Mediana da Intensidade de Fluorescência
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

NEED	Naftiletienodiamino-bicloridrato
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear κB
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	Receptores do Tipo NOD
nNOS	Óxido Nítrico sintase neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Padrão Analítico
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Proteína C Reativa
PD-1	Proteína de Morte Celular Programada 1
PD-L1/L2	Ligante de Proteína de Morte Celular Programada 1
PE	Ficoeritrina
PF	Ponto de Fusão
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
PMN	Polimorfonucleares
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrão
RFA	Resposta de Fase Aguda
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
RVT	Resveratrol
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC	<i>Side Scatter</i>
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador-β
T <sub>H</sub>	<i>T helper</i>
TLR	Receptores do Tipo Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-α
TPA	Acetato de tetradecainol-forbol
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
LTregs	Linfócitos T regulatórios
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular-1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Zy	Zymosan

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I - RESVERATROL E ANÁLOGOS SINTÉTICOS</b> .....	<b>18</b>
1.1 RESVERATROL.....	19
1.1.1 Aspectos limitantes do uso do resveratrol .....	20
1.1.2 Bioprospecção de moléculas sintéticas .....	21
1.2 OBJETIVO.....	23
1.2.1 Objetivo Geral .....	23
1.2.2 Objetivos Específicos .....	23
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.3.1 Resveratrol e análogos .....	24
1.3.2 Avaliação in silico do potencial biológico por meio de propriedades físico-químicas dos análogos.....	27
1.4 RESULTADOS .....	29
1.4.1 Avaliação das propriedades moleculares físico-químicas dos análogos do resveratrol in silico .....	29
1.5 DISCUSSÃO .....	31
1.6 CONCLUSÃO .....	34
<b>CAPÍTULO II - INFLAMAÇÃO E ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS ANÁLOGOS DO RESVERATROL</b> .....	<b>35</b>
2.1 DOENÇAS DE CARÁTER INFLAMATÓRIO.....	36
2.1.1 A inflamação aguda e o surgimento de doenças .....	41
2.1.1.1 Óxido Nítrico no contexto da inflamação.....	47
2.1.2 Imunidade adquirida e o surgimento de um processo inflamatório crônico.....	48
2.1.3 Ação anti-inflamatória do resveratrol .....	53
2.2 OBJETIVOS .....	55
2.2.1 <i>Objetivo geral</i> .....	55
2.2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	55

2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.3.1 Delineamento experimental .....	56
2.3.2 Preparo dos análogos e do resveratrol .....	57
2.3.3 Linhagens celulares .....	57
2.3.4 Culturas de células.....	58
2.3.5 Animais experimentais.....	58
2.3.6 Influência dos análogos do resveratrol na viabilidade de células RAW 264.7 e J774.A1 .....	59
2.3.7 Influência dos análogos do resveratrol na viabilidade de cultura primária de macrófagos peritoneais.....	60
2.3.8 LC <sub>50</sub> dos análogos do resveratrol para RAW 264.7 .....	61
2.3.9 Avaliação da atividade antioxidante do resveratrol e seus análogos .....	61
2.3.10 Influência dos análogos do resveratrol no índice de proliferação celular de esplenócitos .....	62
2.3.11 Avaliação do potencial anti-inflamatório dos análogos do resveratrol...63	
2.3.12 Análise estatística dos ensaios in vitro.....	66
2.3.13 Ensaios in vivo .....	66
2.3.13.1 Atividade anti-inflamatória dos análogos do resveratrol em modelo de edema de orelha .....	66
2.3.13.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do resveratrol e análogos em modelo de artrite induzida por Zymosan .....	67
2.3.14 Análises morfológicas .....	69
2.3.15 Dosagem de mediadores inflamatórios nos tecidos – citocinas, quimiocina e atividade da mieloperoxidase.....	70
2.4 RESULTADOS .....	72
2.4.1 Seleção dos análogos do resveratrol segundo a influência na viabilidade de células RAW 264.7 .....	72
2.4.2 LC <sub>50</sub> dos análogos do resveratrol sobre células RAW 264.7 .....	73
2.4.3 Influência dos análogos do resveratrol na viabilidade de células da linhagem J774.A1 e macrófagos peritoneais.....	74
2.4.4 Potencial antioxidante dos análogos do resveratrol.....	76
2.4.5 Determinação do potencial anti-inflamatório in vitro dos análogos do resveratrol.....	78

2.4.5.1 Influência dos análogos do resveratrol na produção de NO por células RAW 264.7 .....	78
2.4.5.2 Influência dos análogos do resveratrol na produção de citocinas .....	80
2.4.5.3 Influência dos análogos do resveratrol na expressão a molécula MHCII e dos coestimuladores CD80 e CD86 .....	81
2.4.5.4 Influência dos análogos do resveratrol na proliferação de LB e LT .....	83
2.4.5.5 Influência dos análogos na expressão de CTLA-4 em populações de esplenócitos .....	84
<b>2.4.6 Seleção dos análogos para ensaios in vivo de atividade anti-inflamatória.</b>	<b>86</b>
<b>2.4.7 Determinação da atividade anti-inflamatória in vivo .....</b>	<b>88</b>
2.4.7.1 Influência da aplicação tópica dos análogos na inflamação aguda por meio do modelo de edema de orelha.....	88
2.4.7.2 Influência dos análogos do resveratrol em modelo de artrite induzida por Zymosan.....	93
2.5 DISCUSSÃO .....	102
2.6 CONCLUSÃO .....	105

<b>CAPÍTULO III - CÂNCER E ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS ANÁLOGOS DO RESVERATROL .....</b>	<b>115</b>
3.1 NEOPLASIAS MALIGNAS.....	116
<b>3.1.1 Imunologia do tumor .....</b>	<b>117</b>
<b>3.1.3 Ação antitumoral do resveratrol .....</b>	<b>123</b>
3.2 OBJETIVOS .....	126
<b>3.2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>127</b>
<b>3.2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>127</b>
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	128
<b>3.3.1 Preparo dos análogos e do resveratrol .....</b>	<b>128</b>
<b>3.3.2 Avaliação do potencial antitumoral induzido pelos análogos .....</b>	<b>128</b>
<b>3.3.3 LC<sub>50</sub> dos análogos do resveratrol para RAW 264.7, 4T1, B16.F1 e MCF-7 e índice de seletividade .....</b>	<b>128</b>
3.3.3.1 Comparação entre a influência dos análogos do resveratrol e melfalano na viabilidade de células RAW 264.7 e macrófagos peritoneais .....	129
3.4 RESULTADOS .....	130

3.5 DISCUSSAO .....	135
3.6 CONCLUSÃO.....	138
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>139</b>

## INTRODUÇÃO

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina encontrada naturalmente em diversos alimentos, tais como na casca da uva rosada e em alguns tipos de castanhas. Apesar de sua descoberta ter sido reportada no ano de 1940, somente em 1992 o resveratrol começou a chamar a atenção dos pesquisadores por ser capaz de proteger o sistema cardiovascular (BAUR e SINCLAIR, 2006). A partir de então, inúmeras atividades farmacológicas foram atribuídas a esta molécula, dentre as quais destacam-se as atividades antitumoral, anti-inflamatória, antienvhecimento, antioxidante e cardioprotetora (WANG *et al.*, 2010; PATEL, *et al.*, 2011; SOARES-FILHO, CASTRO e STAHLSCHMIDT, 2011; XUZHU *et al.*, 2012; DOBRZYNSKA, 2013).

Apesar de promissor, o resveratrol tem sua aplicação como fármaco limitada, devido à baixa biodisponibilidade (WALLE *et al.*, 2004). Logo, a elaboração de moléculas sintéticas análogas a este composto é uma tática que vem sendo alvo de investigações a fim de se manter ou potencializar a ação da molécula precursora, eliminando, ao mesmo tempo, seus problemas físico-químicos e/ou de biodisponibilidade (GUTIERREZ-GUTIERREZ *et al.*, 2010; GUANTAI, 2011; WELL, 2011).

Esta busca por um análogo mais efetivo adquire substancial importância no cenário da pesquisa de novos fármacos que possam despontar como alternativas eficazes para o tratamento de diversas doenças, as quais têm se tornado mais prevalentes devido ao aumento da expectativa de vida mundial e a mudanças nos hábitos da população (ABEGUNDE *et al.*, 2007; PULSATELLI *et al.*, 2013). Neste contexto, destacam-se as doenças relacionadas direta e indiretamente ao processo inflamatório, como as doenças autoimunes e neoplasias, ambas relacionadas a falhas da imunidade e que podem surgir por exacerbação ou descontrole da inflamação e cujos tratamentos disponíveis implicam debilitação do paciente devido aos efeitos colaterais e reações adversas, além de apresentarem alto custo e não garantirem a cura (IGNEY e KRAMMER, 2002; SILVA, ALBUQUERQUE e LEITE, 2010; DONAHUE *et al.*, 2012; SARMIENTO-MONROY *et al.*, 2012; WIBELINGER e BORGES, 2012; CROWSON *et al.*, 2013; PANCIONE *et al.*, 2014).

Deste modo, a busca por novas moléculas que possam ser empregadas como forma de tratamento preventivo, curativo e/ou paliativo para processos inflamatórios, resultando em uma menor incidência de complicações ao paciente e que sejam de custo acessível, se faz uma necessidade eminente. Diante do exposto, o presente estudo foi dividido em dois capítulos que apresentam, respectivamente, os resultados da investigação do potencial imunomodulatório e antitumoral de análogos do resveratrol, elucidando como estas substâncias impactam nas respostas imunológicas e nos tumores, focando-se na identificação de futuros agentes anti-inflamatórios e/ou antineoplásicos, que possam ser alternativas potenciais para o tratamento de doenças humanas e/ou veterinárias.

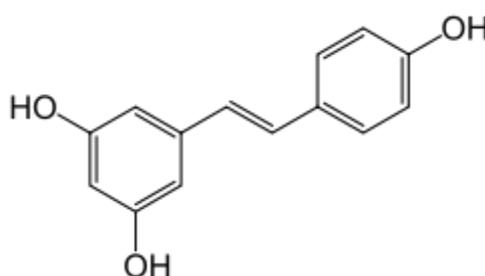
*RESVERATROL E ANÁLOGOS SINTÉTICOS*

## 1.1 RESVERATROL

O 3,5,4'-trihidroxistilbeno, mais conhecido como resveratrol, é o produto do metabolismo especial de algumas espécies vegetais em resposta ao ataque de patógenos, à radiação ultravioleta e à exposição ao ozônio (BURNS *et al.*, 2002; IGNATOWICZ e BAER-DUBOWSKA; 2002).

Cerca de 70 plantas diferentes já foram identificadas com resveratrol em sua composição, incluindo a amora e o amendoim (SVAJGER e JERAS, 2012). Entretanto, destaca-se por apresentar os mais altos teores deste composto, a casca da *Vitis vinífera* ou popularmente, a uva rosada (50-100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), sendo encontrado também em altas concentrações no vinho tinto (1,5-2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (BURNS *et al.*, 2002; IGNATOWICZ e BAER-DUBOWSKA, 2002; BAUR e SINCLAIR, 2006; ELMALI *et al.*, 2007).

Quimicamente, o resveratrol, é composto por dois anéis fenólicos ligados por uma dupla ligação estireno (figura 1), sendo classificado como um estilbeno. Possui partes polares e apolares que faz com seja solúvel em etanol. Sua estrutura ainda permite que existam os isômeros cis e trans. Os efeitos farmacológicos estudados até o momento, dizem respeito ao isômero trans, porém, o isômero cis também tem sido intensamente investigado devido ao seu potencial, apesar de o mesmo não ser disponível comercialmente (SVAJGER e JERAS, 2012) (Figura 1).



**Figura 1: Estrutura molecular do resveratrol.**

Billack, Radkar e Adiabouah (2008) descreveram que a hidroxila (-OH) na posição 4' é a principal responsável por alguns efeitos genotóxicos atribuídos ao resveratrol. No entanto, para Larrossa, Tomas-Barberan e Espin (2003) esta também é a explicação para o efeito antitumoral sobre algumas linhagens celulares (ex.

melanoma) apresentado pelo composto, juntamente com hidroxilas nas posições 3 e 5'.

Inúmeros estudos demonstraram a capacidade do resveratrol em prevenir ou diminuir a progressão dos danos causados pelos radicais livres, tais como câncer (WANG *et al.*, 2010), doenças cardíacas e isquêmicas (SOARES-FILHO, CASTRO e STAHLSCHEMIDT, 2011), danos causados pelo estresse (HOLTHOFF *et al.*, 2010) e pelo envelhecimento (KIM, JOO LEE e WON, 2002). Os radicais livres são espécies químicas instáveis, com um elétron desemparelhado. O resveratrol, no entanto, tem a capacidade de ceder um elétron para esta espécie reativa, sendo estabilizado por efeito de ressonância (QUEIROZ *et al.*, 2009). Além disso, o composto age como inibidor de uma série de doenças autoimunes e inflamatórias como o diabetes, encefalomielite, colite, artrite reumatoide, etc. (XUZHU *et al.*, 2012).

### **1.1.1 Aspectos limitantes do uso do resveratrol**

Em detrimento de todas as importantes funções farmacológicas exibidas pelo resveratrol este composto apresenta, em mamíferos, uma biodisponibilidade extremamente baixa, além de sofrer rápida depuração na circulação sanguínea que restringe imensamente sua ação. Embora a administração de doses mais elevadas tenha sido uma tentativa de melhorar sua eficácia, esta estratégia não foi vista de forma satisfatória uma vez que isso aumentaria o risco de efeitos tóxicos, já observados em doses acima de 1,0g/kg (peso corporal) (BAUR e SINCLAIR, 2006).

As possibilidades futuras para a aplicação extensiva do resveratrol incluem uma via de administração diferente da oral ou estratégias na formulação em que este ativo será veiculado. Outra alternativa é o desenvolvimento de derivados do resveratrol que apresentem um melhor perfil de biodisponibilidade a partir de uma abordagem racional para alcançar resultados *in vivo* similares àqueles que têm sido obtidos *in vitro* (STAKLEFF *et al.*, 2012).

Neste contexto, várias hipóteses têm sido postuladas a fim de resolver o problema do uso do resveratrol *in vivo*. Dentre elas estão o bloqueio do seu metabolismo, a associação com outras substâncias bioativas e, principalmente, a utilização de análogos que mantenham ou sobrepujem as propriedades

farmacológicas do composto original, mas que apresentem melhor biodisponibilidade (BAUR e SINCLAIR, 2006; NGUYEN, 2009).

De fato, alguns compostos análogos do resveratrol já foram testados para sua atividade antioxidante (CALIL *et al.*, 2012), despigmentante (ZIMMERMANN-FRANCO *et al.*, 2012), neuroprotetora (TAKIZAWA *et al.*, 2015), cardioprotetora (ABBAS, 2016), dentre outras (PAVAN *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2013), obtendo-se resultados satisfatórios. Além disso, as ações antitumoral (SIDDIQUI *et al.*, 2013; MORRIS *et al.*, 2015; PENTHALA, THAKKAR e CROOKS, 2015; SAVIO *et al.*, 2016), anti-inflamatória (ANTUS *et al.*, 2015) e imunomoduladora (JEONG *et al.*, 2012) de análogos do resveratrol têm sido recentemente reportadas, instigando ainda mais a pesquisa de novas atividades farmacológicas com compostos desta classe.

### **1.1.2 Bioprospecção de moléculas sintéticas**

A natureza é uma fonte extremamente rica de potenciais agentes com atividade farmacológica, sendo alguns fármacos antitumorais exemplos notáveis de produtos naturais com atividade terapêutica, tal como os alcalóides da vinca e seus derivados semi-sintéticos, vindesina e vinorelbina (SOUZA, 2004).

Após a descoberta acidental ou racional de um produto natural biologicamente ativo, a abordagem convencional para o desenvolvimento de produtos naturais tem sido o fracionamento biomonitorado de extratos derivados de tal material e o isolamento e caracterização subsequente de compostos ativos puros presentes no mesmo (GUANTAI e CHIBALE, 2011).

Wells (2011) descreveu o processo padrão de bioprospecção como, em primeiro lugar, a identificação inicial dos produtos naturais que servirão de suporte para a pesquisa; em seguida, a realização de modificações na molécula de interesse por meio da Química Medicinal; em terceiro, o desenvolvimento de formulações e, por último, a combinação com outras terapias, se necessário. É importante investigar ainda, se o isolamento de uma molécula não faz com que a mesma perca sua atividade farmacológica, considerando o processo de sinergismo e estabilização química que pode ocorrer quando a mesma está inserida em um complexo natural.

Atualmente, de modo a colaborar com a triagem de moléculas sintéticas, existem *softwares* que são capazes de avaliar *in silico* o potencial que a droga tem de se tornar uma futura molécula bioativa. Uma destas análises é feita com base na regra de Lipinski ou “regra de 5” - fazendo referência ao ponto de corte de cada parâmetro, todos múltiplos de 5 - elaborada por Lipinski (1995). Assim, os seguintes parâmetros são avaliados devendo seu valor estar abaixo do limite estabelecido para cada um: o coeficiente de partição octanol/água (LogP) deve ser menor ou igual a 5; o peso molecular, menor ou igual a 500; número de aceptores para ligações de hidrogênio, deve ser menor ou igual a dez; o número de ligações doadoras de hidrogênio, menor ou igual a 5. Outro aspecto de interesse a ser avaliado é a área da superfície topológica polarizada (TPSA), inicialmente publicada por Ertl *et al.* (2000) e que diz respeito a capacidade que a molécula possui para atravessar as membranas biológicas. Observando estes parâmetros *in silico*, o resveratrol demonstra ser uma molécula promissora tendo em vista que não viola os critérios básicos observados por Lipinski *et al.* (1995) e Ertl *et al.* (2000).

Desta forma, a identificação de moléculas bioativas promissoras funciona como estímulo para os esforços na Química Medicinal voltados para a síntese parcial ou total destes compostos, conhecidos como análogos (GUANTAI e CHIBALE, 2011). Uma vantagem dos análogos sintéticos é poder oferecer uma fonte suplementar do composto de interesse, permitindo sua produção em quantidades satisfatórias. Além disso, muitos desses análogos, com base nas relações estrutura-atividade, conseguem ser mais potentes e/ou superarem dificuldades físico-químicas e barreiras biológicas apresentadas pelos produtos naturais (QUASTHOFF e HARTUNG, 2002; GUANTAI e CHIBALE, 2011; GUTIERREZ-GUTIERREZ *et al.*, 2010; OCEAN e VAHDAT, 2004). Esta forma de investigação tem levado à identificação de diversos compostos estruturalmente relacionados a moléculas bioativas de diferentes classes químicas (HADI *et al.*, 2013), como tem ocorrido com o resveratrol.

## 1.2 OBJETIVO

### 1.2.1 Objetivo Geral

Realizar a análise *in silico*, preditora para atividade biológica, de uma série de quinze análogos do resveratrol.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar parâmetros físico-químicos com base na estrutura molecular dos análogos aplicando-se a Regra de Lipinski.
- Avaliar parâmetros físico-químicos com base na estrutura molecular dos análogos calculando-se a TPSA dos análogos.

### 1.3 MATERIAL E MÉTODOS

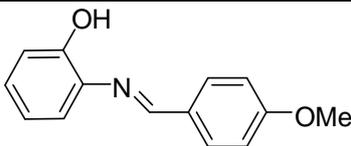
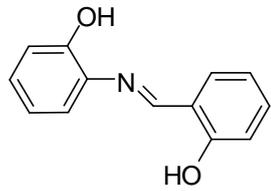
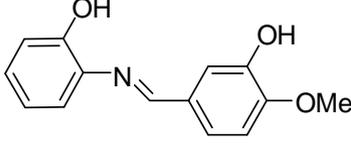
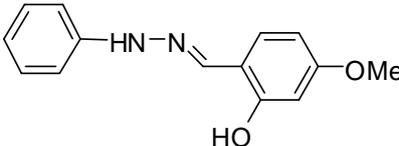
#### 1.3.1 Resveratrol e Análogos

O resveratrol foi obtido de forma comercial através da empresa Fagron, com teor mínimo descrito como 99% (segundo laudo do fabricante).

Todos análogos do resveratrol (AR) utilizados neste estudo foram sintetizados e fornecidos pelo professor Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Utilizou-se uma partida inicial de 15 análogos (Tabela 1), pertencentes à diferentes funções orgânicas (iminas, hidrazonas e tioiminas).

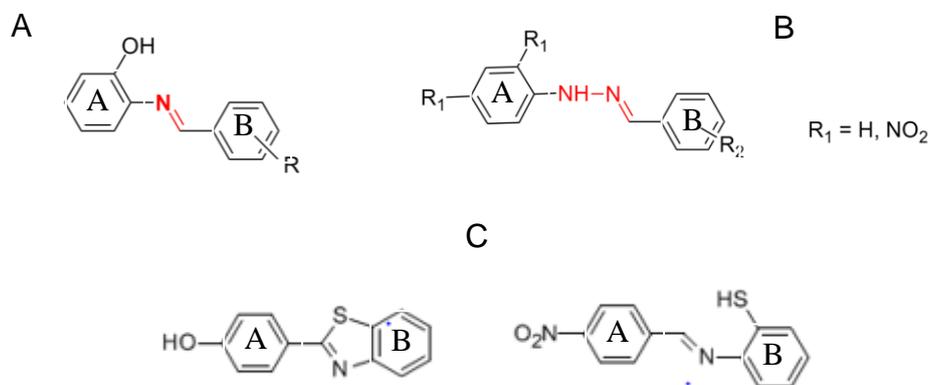
**Tabela 1:** Análogos do resveratrol utilizados, sua fórmula molecular, massa molar ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e classe química.

ANÁLOGO	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA	MASSA MOLAR ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	CLASSE
AR07	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$		227,09	Imina
AR08	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$		213,08	Imina
AR13	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_3$		243,09	Imina
AR16	$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$		242,27	Hidrazona

AR22	$C_{13}H_{11}NO_3$		229,23	Imina
AR23	PROTEGIDO	PROTEGIDO	292,13	Imina
AR25	$C_{14}H_{11}NO_3$		241,24	Imina
AR26	$C_{14}H_{11}NO_3$		241,24	Imina
AR32	$C_{14}H_{12}N_4O_6$		332,27	Hidrazona
AR33	PROTEGIDO	PROTEGIDO	228,25	Hidrazona
AR35	$C_{14}H_{12}N_2O_2$		240,26	Hidrazona
AR38	$C_{14}H_{10}N_4O_6$		330,25	Hidrazona
AR39	$C_{13}H_9BrN_4O_5$		381,14	Hidrazona
AR70	$C_{13}H_9NOS$		227,28	Tioimina
AR76	$C_{13}H_{10}N_2O_2S$		258,30	Tioimina

Todos os análogos foram sintetizados pelo método convencional de formação de iminas que consiste na condensação de uma dada amina com aldeídos aromáticos, em quantidade equimolar, usando etanol como solvente à temperatura ambiente. Para

a síntese dos compostos AR07, AR08, AR13, AR22, AR23, AR25 e AR26 a amina de partida foi a 2-hidroxianilina, para AR16, AR33, AR35, AR36 e AR38, a fenilhidrazina e para AR32 e AR39, a 2,4-dinitrofenilhidrazina. Já para a obtenção dos compostos AR70 e AR76, foi utilizada a oaminotiofenol (Figura 2).



**Figura 2: Estrutura geral das (A) iminas, das (b) hidrazonas (c) e as tioiminas, análogas ao resveratrol.** Na figura está indicado em cada estrutura o anel nomeado como A e o anel B.

Todos os compostos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) e definidos seus pontos de fusão (PF) (Tabela 2) usando um aparelho digital Microquímica MQAPF-301. Os espectros de <sup>1</sup>H RMN foram registrados num espectrômetro Bruker AC-300 e os espectros de <sup>13</sup>C RMN foram registrados num Bruker AC-300 a 75 MHz. Os desvios químicos ( $\delta$ ) são dados em partes por milhão relativos ao tetrametilsilano (TMS). Os espectros foram adquiridos em dimetilsulfóxido (DMSO). Os reagentes e materiais foram obtidos de fornecedores comerciais e foram utilizados sem purificação. Todos os reagentes usados foram de grau analítico.

A faixa de fusão determinada para o resveratrol foi de 263.8-267 °C, estando de acordo com a literatura (WESOLOUSKA, 2008; HA *et al.*, 2011).

**Tabela 2:** Caracterização dos compostos por ressonância magnética nuclear (RMN), ponto de fusão (PF) e rendimento na produção dos análogos.

SUBSTÂNCIA	$\delta$ <u>C</u> H=N	$\delta$ <u>C</u> =N	PF (°C)	Rendimento (%)
AR07	8,96	160,8	149,0 – 150,3	90
AR08	8,62	158,5	90,1 – 92,0	66
AR13	8,48	159,5	125,0 – 126,7	60
AR16	7,81	143,3	120,0 – 121,1	33
AR22	8,80	158,3	245,0 – 246,5	49
AR23	Protegido	Protegido	186,0 – 187,8	98
AR25	7,87	158,3	245,0 – 246,5	49
AR26	8,78	160,3	149,2 – 150,8	91
AR32	ND	ND	233,0 – 234,6	40
AR33	Protegido	Protegido	155,4 – 154,7	95
AR35	ND	ND	153,0 – 154,8	ND
AR36	7,92	142,6	161,2 – 162,5	89
AR38	8,36	144,4	131,7 – 133,3	85
AR39	8,37	145,6	239,0 – 240,7	63
AR70	ND	167,4	227,0 – 228,5	35
AR76	6,44	149,5	120,8 – 121,9	85

\*Os experimentos de RMN foram realizados no espectrômetro de 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$  em dimetilsufóxido (DMSO- $d_6$ ) (ppm).  
ND: não determinado.

Dois análogos, AR23 e AR33, tiveram sua fórmula e estrutura química preservadas tendo em vista o interesse de continuar a investigação com os mesmos e a utilização destes resultados para outros fins diferentes de publicações científicas.

### 1.3.2 Avaliação *in silico* do potencial biológico por meio de propriedades físico-químicas dos análogos

A avaliação do potencial biológico dos 15 análogos foi realizada *in silico* antes de serem iniciados os ensaios *in vitro*. Seguindo a regra elaborada por Lipinski *et al.* (1995), para que compostos tenham potencial biológico é prudente que atendam

determinados valores para os parâmetros avaliados:  $\text{LogP} \leq 5$ , peso molecular (PM)  $\leq 500$ , número de receptores de hidrogênio (nON)  $\leq 10$  e de doadores de hidrogênio (nOHNH)  $\leq 5$ . Além disso, a TPSA também foi avaliada, devendo esta ser menor ou igual a 150, de modo a ter boa permeabilidade em diferentes membranas biológicas do organismo (ERTL *et al.*, 2000; PAJOUHESH e LENZ; 2005). Quando não há violações para a regra de Lipinski, sugere-se que a molécula tem bom comportamento farmacocinético, biodisponibilidade e bioatividade (BARTZATT *et al.*, 2001).

Análogos que apresentassem até uma violação da regra de Lipinski ou apenas a extrapolação do valor estabelecido para a TPSA não foram excluídos da etapa inicial de triagem. Estas análises foram realizadas utilizando a ferramenta *online Molinspiration*® e avaliadas para cada análogo individualmente.

## 1.4 RESULTADOS

### 1.4.1 Avaliação das propriedades moleculares físico-químicas dos análogos do resveratrol *in silico*

Para avaliar as propriedades moleculares, todos os análogos foram testados quanto a concordância com a regra de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 1995) e TPSA (ERTL *et al.*, 2000), ambas preditoras de atividades biológicas e úteis para compostos que ainda não foram testados *in vivo*, como os que compuseram o presente estudo. Os resultados para cada análogo e para o resveratrol estão dispostos na tabela abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3:** Avaliação de propriedades moleculares físico-químicas dos análogos de acordo com a regra de Lipinski e TPSA.

COMPOSTO	REGRA DE LIPINSKI	Violações da regra	TPSA
AR07	LogP=3,26; PM=227,09; nON=3; nOHNH=1	0	41,83
AR08	LogP=3,14; PM=213,24; nON =3; nOHNH=2	0	52,85
AR13	LogP=2,54; PM=243,26; nON=3; nOHNH=2	0	62,05
AR16	LogP=4,74; PM=242,28; nON=4; nOHNH=2	0	53,85
AR22	LogP=2,64; PM=229,24; nON=4; nOHNH=3	0	73,05
AR23	LogP=3,93; PM=292,13; nON=3; nOHNH=2	0	52,82
AR25	LogP=3,11; PM=241,25; nON=4; nOHNH=2	0	69,89
AR26	LogP=2,73; PM=241,25; nON=4; nOHNH=2	0	69,89
AR32	LogP=3,95; PM=332,27; nON=10; nOHNH=2	0	145,50
AR33	LogP=4,20; PM=228,25; nON=4; nOHNH=3	0	64,85
AR35	LogP=4,67; PM=240,26; nON=4; nOHNH=2	0	61,69
AR38	LogP=4,52; PM=330,26; nON=10; nOHNH=2	0	153,34
AR39	LogP=5,33; PM=381,14; nON=9; nOHNH=2	1	136,27
AR70	LogP=3,81; PM=227,29; nON=2; nOHNH=1	0	33,12
AR76	LogP=3,61; PM=258,30; nON=4; nOHNH=0	0	58,19
Resveratrol	LogP=2,99; PM=228,25; nON=3; nOHNH=3	0	60,68

De acordo com os resultados obtidos, apenas o análogo AR39 apresentou uma violação para a regra de Lipinski, sendo esta referente ao coeficiente de partição octanol/água, que sugere a capacidade que a molécula tem em ser absorvida e atravessar membranas biológicas. Todos os demais compostos não apresentaram violações à regra de Lipinski.

Com relação ao valor de TPSA, apenas o AR38 apresentou valor superior a 150, sendo portanto considerado de pobre permeabilidade em compartimentos lipossolúveis. Para fins de comparação, a lactulose, uma substância de mínima absorção por via oral, apresenta TPSA igual a 197.4 (ERLT *et al.*, 2000). Os demais apresentaram valores inferiores para tal parâmetro, sendo o menor deles calculado para o AR07 (41,83), valor este muito próximo ao apresentado na literatura para o nordiazepan (41,5) (ERLT *et al.*, 2000).

## 1.5 DISCUSSÃO

O resveratrol é um composto natural bastante promissor tendo em vista suas inúmeras ações biológicas já bem estabelecidas, inclusive como anti-inflamatório e imunomodulador. No entanto, o problema limitante para sua ampla utilização relaciona-se à baixa biodisponibilidade que apresenta (LI *et al.*, 2014). Apesar disso, esta molécula é um protótipo molecular ideal para ser explorado no que diz respeito à síntese de análogos (POLONINI *et al.*, 2013). Neste estudo, avaliou-se uma série de análogos do resveratrol primeiramente em testes *in silico* e, a seguir, *in vitro* e *in vivo* a fim de elucidar sua ação sobre o funcionamento das células efectoras do sistema imune e efeito sobre células tumorais com o propósito de direcionar a descoberta de novos compostos com potencial anti-inflamatório/imunomodulador e/ou antitumoral que possam ser alternativas ao resveratrol.

Neste contexto, uma das principais vantagens dos análogos sintéticos é o fato de serem uma fonte suplementar do composto, sendo possível a produção do mesmo em uma quantidade satisfatória. Além disso, análogos em geral podem manter ou melhorar as qualidades da molécula precursora, corrigir problemas estruturais, tal como o de biodisponibilidade e de toxicidade (GUTIERREZ-GUTIERREZ *et al.*, 2010; GUANTAI e CHIBALE, 2011; WELLS, 2011; COSTA *et al.*, 2015). Os análogos testados aqui apresentam ainda como vantagem o fato de serem obtidos em apenas uma etapa em sua rota química, além de serem derivados de materiais de baixo custo e de fácil acesso.

Seguindo esta premissa, foram produzidos 15 polifenóis sintéticos, análogos do resveratrol, pertencentes à classe das hidrazonas, tioiminas e iminas, que, em seguida, foram testados *in silico* para avaliação de seu potencial biológico. A análise geral do teste *in silico* revelou que apenas dois análogos apresentaram restrições, sendo eles o AR038 e o AR039, duas hidrazonas com violações referentes ao LogP (regra de Lipinski) e TPSA, respectivamente. Ambas variáveis têm relação com a hidrofobicidade/lipofilicidade da molécula, apesar de levar em consideração critérios

distintos (BARTZATT *et al.*, 2003). Deste modo, a avaliação das propriedades físico-químicas da molécula *in silico* sugeriu que estes dois análogos teriam menor capacidade de penetrar as membranas biológicas que os demais compostos avaliados por possuírem caráter hidrofílico, dificultando assim, sua absorção (GOMES *et al.*, 2014).

Tratando-se das hidrazonas, esta é uma classe de compostos orgânicos com a estrutura  $R_2C=NNR_2$ , geralmente oriundos de aldeídos ou cetonas (KARAMAN *et al.*, 2016). As hidrazonas são consideradas como substratos potenciais para a concepção de novos fármacos estando relacionadas a várias atividades biológicas tais como antioxidante, anticonvulsivante, antidepressiva, antimicrobiana, antitumoral, inibidora da anticolinesterase, analgésica e anti-inflamatória (ABDEL-WAHABE *et al.*, 2011; EMAMI e DADASHPOUR, 2015; GAIKWAIID *et al.*, 2015; ROMAN, 2015). Neste sentido, já foi atribuída atividade inibitória da tirosinaquinase ao composto AR16, uma hidrazona avaliada neste estudo (MARK CUSHMAN *et al.*, 1991).

Sobre a classe das tioiminas ou tio-bases de Schiff, estas são descritas como de fácil síntese e modificação de grupos substituintes (CHANG *et al.*, 2015). Os compostos desta classe AR70 e AR76 já foram relacionados à atividade antioxidante *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2013).

No caso das iminas, o grupo CH envolvido na ligação C=C presente no resveratrol, foi substituído por um átomo de nitrogênio obtendo-se assim, o esqueleto aza-estilbeno (C=N), sendo estas moléculas também conhecidas como Bases de Schiff (LU *et al.*, 2012). Conforme relatado anteriormente, este é um tipo de substituição destacada por facilitar a geração de análogos do resveratrol e aumentar a possibilidade de desenvolver compostos com melhor biodisponibilidade mantendo as propriedades fundamentais do resveratrol (LU *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014). Algumas iminas análogas do resveratrol que fazem parte deste estudo já vêm sendo testadas para atividades biológicas diversas com êxito, tal como fotoproteção (AR07 e AR08) (POLONINI *et al.*, 2013); potencial antioxidante via inibição do fator nuclear 2 relacionado ao fator E2 (Nrf2) (LI *et al.*, 2014) e atividade antitumoral (WANG *et al.*, 2017) (AR08); e inibição da tirosinaquinase (AR13 e AR22) (BAE *et al.*, 2012).

Estruturalmente, as iminas AR07, AR08 e AR13 são bastante semelhantes apresentando, respectivamente, um grupamento éter metílico em posição para-dirigente; uma hidroxila em posição orto-dirigente; e uma hidroxila (3') e um éter metílico (4'), sendo, no entanto, possíveis de apresentarem diferenças em suas

atividades biológicas decorrentes destas substituições que apresentaram no anel B. Do mesmo modo, os análogos AR25 e AR26 diferem unicamente pela posição do carboxilato, sendo no primeiro composto na posição para-dirigente e no segundo, em orto-dirigente. Cabe destacar que as iminas avaliadas neste estudo apresentaram baixos valores de TPSA, algumas delas com níveis comparáveis ao do nordiazepan (uma droga de ação SNC), o que sugere uma boa permeabilidade às membranas biológicas, inclusive de compartimentos mais protegidos como a barreira hematoencefálica (ERLT *et al.*, 2000). Este dado aliado à atividades imunomoduladoras podem servir para impulsionar a continuidade das investigações da ação de tais moléculas em doenças inflamatórias que afetam o SNC, tal como a esclerose múltipla.

## 1.6 CONCLUSÃO

A avaliação *in silico* identificou uma violação nas análises para o AR38 e uma para AR39. No entanto, estas não conformidades não foram consideradas suficientes para a exclusão dos análogos dos estudos posteriores. Os demais análogos mostraram-se promissores nos quesitos avaliados *in silico*.

Sendo assim, os 15 análogos foram direcionados para testes referentes à atividade anti-inflamatória e antitumoral.

*INFLAMAÇÃO E ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA DOS  
ANÁLOGOS DO RESVERATROL*

## CAPÍTULO II

### 2.1 DOENÇAS DE CARÁTER INFLAMATÓRIO

No Brasil, assim como em todo o globo, observa-se o fenômeno do “envelhecimento” populacional associado à transformação nas relações entre as pessoas e seu ambiente. Este é o principal motivo para que haja a transição do perfil de morbimortalidade com diminuição da ocorrência de doenças infecto-contagiosas e aumento de doenças crônico-degenerativas que passam a ser vistas como novo centro de atenção dentre os problemas de doença e morte da população (BRASIL, 2014).

As doenças crônicas são responsáveis por cerca de 60% da mortalidade global, sendo que 80% das mortes ocorrem em países de baixa e média renda. Destes óbitos, um quarto é referente a homens e mulheres com idade inferior a 60 anos (UNWIN e ALBERT; 2006; SCHMIDT *et al.*, 2011; NA *et al.*, 2015). Sendo assim, impactam como a principal causa de mortalidade em pessoas com idade produtiva, contribuindo para a perda de rendimentos, de oportunidades de investimento e níveis totais mais baixos de desenvolvimento econômico (UNWIN e ALBERT; 2006; GRAFT-AIKINS *et al.*, 2012). Atualmente, sabe-se que o sistema imunológico tem grande relevância no surgimento de inúmeras destas doenças sendo, por isso, um alvo importante para prevenir sua incidência, trata-las ou minimizar suas complicações (JANEWAY, TRAVERS e WALPORT; 2001).

Inúmeras doenças são marcadas pela presença da inflamação em seu curso com caráter agudo ou crônico. A inflamação precisa contar com mecanismos muito bem controlados que permitam promover o seu declínio, uma vez extinguido o agente iniciador da mesma. Este fenômeno natural do organismo se torna um problema mais grave quando envolve uma perda de tolerância e/ou de processos regulatórios, tendo assim a capacidade de promover um dano irreparável e excessivo para os tecidos do hospedeiro. (CALDER *et al.*, 2009).

As doenças que estão relacionadas a inflamação são tão distintas e numerosas que se torna quase impossível sua enumeração. A título de ilustração,

podem ser destacadas algumas de caráter agudo, tais como: as diferentes infecções bacterianas, virais e fúngicas; e a lesão de um tecido por causas mecânicas, químicas ou biológicas. No caso da inflamação crônica, pode ser destacada a contribuição deste evento no surgimento do câncer, aterosclerose, a obesidade, asma e doenças relacionadas com o sistema nervoso central (SNC), tais como depressão e doença de Parkinson. Além disso, no cenário das doenças inflamatórias crônicas, as doenças autoimunes não podem deixar de ser mencionadas (LAVETI *et al.*, 2013; NATHAN, 2015).

A relevância, portanto, das doenças de caráter inflamatório no contexto de saúde pública é indiscutível, tendo em vista que o número de pessoas afetadas é assustador e que os portadores de inflamações crônicas vêm aumentando ao longo das últimas décadas: uma triagem epidemiológica estimou para 2030 que 171 milhões de pessoas serão afetadas apenas nos Estados Unidos (ANDERSON E HORVATH, 2004).

O tratamento para tais doenças requer, basicamente, o uso de medicamentos anti-inflamatórios. Para aquelas de curso rápido e fácil resolução geralmente são empregados os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES). Dependendo de sua gravidade, pode ser indicado o uso dos anti-inflamatórios esteroidais (glicocorticoides) que estão relacionados a diversos efeitos secundários graves (CICCHITTI, MARTELLI e CERRITELI, 2015). Para os casos mais complicados, o uso de drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas ou biológicas e imunossupressores podem ser requeridos (SCHETT, 2007; MOTA *et al.*, 2012; PAWAR *et al.*, 2012).

Os AINES podem ser inibidores seletivos ou não-seletivos de cicloxigenase e apresentam atividades antipirética, anti-inflamatória e analgésica, sendo amplamente úteis para tratar a dor sintomática em condições agudas. Entretanto, efeitos adversos são frequentemente associados ao uso de AINES não-seletivos, tais como manifestações no trato gastrointestinal (úlceras, hemorragias, dispepsia, diarreia, etc.), alterações na pressão arterial, aumento do risco de doenças cardiovasculares (naproxeno), sendo este último também extensivo aos fármacos AINES seletivos. Os medicamentos desta classe estão envolvidos em uma ampla gama de interações medicamentosas e seu uso deve ser monitorado em pacientes idosos, portadores de doenças renais, cardíacas ou hepáticas, com histórico de hipertensão arterial, asma, rinite alérgica e outras desordens do tecido conjuntivo. A toxicidade cumulativa e o risco de reações graves (ex. Síndrome de Stevens-Johnson) são algumas das razões

para que estes agentes não sejam usados em tratamentos a longo prazo (LAAR *et al.*, 2012).

Já os anti-inflamatórios esteroidais ou corticosteroides, devido ao seu potencial imunossupressor, têm sido empregados como adjuvantes efetivos no tratamento de diversas condições inflamatórias crônicas, porém, os efeitos adversos oriundos de longos períodos de uso reduzem sua utilidade para tratamentos crônicos. Dentre os principais efeitos adversos destacam-se: a osteoporose que aumenta o risco de fraturas, a imunossupressão elevando o risco de infecções oportunistas, ganho de peso, fragilidade cutânea, fraqueza muscular, síndrome semelhante à Síndrome de Cushing, surgimento de diabetes ou agravamento da doença (se esta já estiver presente), hipertensão, glaucoma, catarata e dificuldade de cicatrização (WATANABE e BRUERA, 1994; GROSSMAN *et al.*, 2010).

Outras drogas com potente ação imunossupressora como a ciclofosfamida, a azatioprina e as ciclosporinas podem ser consideradas em casos mais graves, em especial, as complicações de doenças autoimunes. Seu uso limitado se faz devido a alta toxicidade destes medicamentos, como mielossupressão grave, aumento da ocorrência de infecções, esterilidade, toxicidade vesical e aumento da ocorrência de neoplasias (MOTA *et al.*, 2012).

As DMCDs sintéticas são indicadas em certos tipos de doenças autoimunes, como a artrite, as doenças inflamatórias intestinais, etc. São pertencentes a esta classe de medicamentos: a hidroxicloroquina, a sulfasalazina, sais de ouro, o metotrexato, a leflunomida (SHARP *et al.*, 2000; SUAREZ-ALMAZOR *et al.*, 2000; AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON RHEUMATOID ARTHRITIS GUIDELINES, 2002; SAXNE *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2014). Apesar da eficácia destes medicamentos, inúmeros efeitos adversos e limitações de seu uso referentes a doenças pré-existentes já foram relacionados, como pode ser visto no quadro 1.

**Quadro 1:** Drogas modificadoras do curso da doença (DMCD), seus principais efeitos adversos e limitações de seu uso.

<b>DMCDS SINTÉTICAS</b>	<b>EFEITOS ADVERSOS</b>	<b>LIMITAÇÕES NO USO</b>
Hidroxicloroquina	Intolerância gastrointestinal (náuseas, vômitos, dor abdominal), hiperpigmentação da pele, cefaleia, tontura, miopia e retinopatia. Indica-se monitoração oftalmológica regular (avaliação inicial e anual após cinco anos, ou anual desde o princípio, se houver fatores de risco: pacientes com disfunção renal ou hepática, com maculopatia, idosos ou dose cumulativa superior a 1000 g/ano)	Pacientes com alterações na retina e de campo visual, hipersensíveis a sulfas e sacilatos.
Sulfasalazina	Intolerância gastrointestinal (anorexia, náuseas, vômitos), exantema cutâneo, elevação de enzimas hepáticas, úlceras orais e mielossupressão (leucopenia com neutropenia). Podem ser observadas pneumonia de hipersensibilidade, manifestações neurológicas ou alterações da fertilidade masculina.	Pacientes portadores de porfiria, com obstruções do aparelho digestório ou geniturinário.
Metotrexato	Anemia, neutropenia, náuseas e vômitos, mucosite e elevação de enzimas hepáticas e necessidade de reposição no ácido fólico.	Pacientes com insuficiência renal, hepatopatias, etilismo, supressão de medula óssea, mulheres em idade fértil com risco de engravidar.
Leflunomida	Náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia, alterações das enzimas hepáticas, exantema cutâneo e Hipertensão Arterial Sistêmica.	Mulheres com risco de engravidar, gestantes e lac pacientes portadores de insuficiência renal e hepatopatias.
Sais de ouro	Mielotoxicidade (marcadamente trombocitopenia), úlceras orais, reações cutâneas (dermatite esfoliativa), nefropatia (podendo haver proteinúria nefrótica) e doença intersticial pulmonar	Pacientes portadores de distúrbios na retina e do campo visual e hipersensibilidade aos componentes da fórmula.

FONTE: Adaptado de Sharp *et al.* (2000), Suarez-Almazor *et al.* (2000), American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines (2002), Saxne *et al.* (2003) e Lee *et al.* (2014).

Existem ainda as DCMDs biológicas ou “novas DMCD”, que são os bloqueadores de TNF (adalimumabe, etanercepte e infliximabe), depletors de linfócito B (rituximabe), moduladores da coestimulação (abatacepte) e antagonistas do receptor de IL-1 (Anankira) e IL-6 (tocilizumabe). Em geral, apresentam um bom

perfil de eficácia e segurança e são capazes de interferir em pontos de regulação imune alterados, interferindo no curso de várias doenças autoimunes e reumatólogicas (ROSMAN, SHOENFELD e ZANDMAN-GODDARD; 2013). A indicação destes medicamentos é feita para os pacientes que persistem com a atividade inflamatória de uma doença apesar de já estarem em tratamento com outro medicamento ou combinações dos mesmos. As desvantagens, no entanto, dizem respeito ao seu custo elevado, a administração feita por via parenteral, a necessidade de o paciente ser monitorado por um especialista e aos efeitos colaterais e reações adversas, destacando-se o maior risco de infecções devido ao efeito imunossupressor de tais agentes (BÉRTOLO *et al.*, 2007).

Por fim, o uso de alguns potentes imunossupressores como a ciclofosfamida, as ciclosporinas e a azatioprina, também podem ser indicados para o tratamento de casos mais graves e complicados, tal como pacientes portadores de artrite reumatoide com manifestações extra-sistêmicas. Estes fármacos apresentam elevada toxicidade (MOTA *et al.*, 2012).

Um ponto importante a ser observado é que, dependendo da doença, o uso destes medicamentos deverá ser crônico, tendo em vista que eles são capazes apenas de reduzir as manifestações patológicas e incômodos relacionados a progressão da doença. Uma revisão realizada por Bosma-den Boer, van Wetten e Pruijboom (2012) destacou que os medicamentos atuais usados para tratar manifestações inflamatórias crônicas suprimem os sintomas, mas não promovem a resolução completa da doença, conduzindo a um baixo grau de inflamação persistente. Os autores ainda alegaram que o uso crônico de medicação anti-inflamatória poderia impedir o organismo de promover uma recuperação completa como pode ocorrer em doenças como a síndrome metabólica, as doenças neurodegenerativas, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), a doença inflamatória crônica do intestino, as doenças cardiovasculares e a artrite reumatoide (CICCHITTI, MARTELLI e CERRITELI, 2015).

Diante disso, torna-se evidente a necessidade de alternativas terapêuticas que otimizem o tratamento, fornecendo melhores resultados clínicos, menos efeitos colaterais e reações adversas e que também sejam economicamente viáveis. Todas estas variáveis juntas contribuem para uma melhor qualidade de vida dos pacientes portadores de doenças crônicas, especialmente.

Maiores detalhes sobre o processo inflamatório agudo e crônico e como estes contribuem para o surgimento e instalação de inúmeras doenças serão abordados a seguir.

### **2.1.1 A inflamação aguda e o surgimento de doenças**

A imunidade inata é constituída por barreiras físicas, químicas e biológicas, por células especializadas como células dendríticas (CDs), basófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e natural killer (NK) e moléculas solúveis (como Sistema do Complemento). Esta imunidade natural é de expressão ubíqua em todos os indivíduos, independente de um contato prévio com imunógenos ou agentes agressores. Além disso, seu padrão de resposta não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato com os mesmos. A inflamação aguda é um evento associado fortemente à imunidade inata que proporciona uma resposta rápida e padronizada contra um vasto, porém limitado, repertório de estímulos (MEDZITHOV e JANEWAY, 2000).

O processo inflamatório é desencadeado pela presença de agentes estranhos ou alguma lesão tecidual que atua como o estímulo para a resposta inflamatória, cujo objetivo é destruir este agente agressor e reparar o tecido. Assim, a lesão inicial de um tecido libera neuropeptídeos, estimula uma vasoconstrição transitória seguida de uma vasodilatação induzida pela liberação de histamina por mastócitos ativados. A etapa seguinte é marcada pela migração de leucócitos e de células fagocíticas para o sítio da lesão, denominada quimiotaxia, onde as primeiras células a chegarem são os neutrófilos que atuam fagocitando e liberando enzimas lisossomais destrutivas (SIEGELMAN *et al.*, 2000).

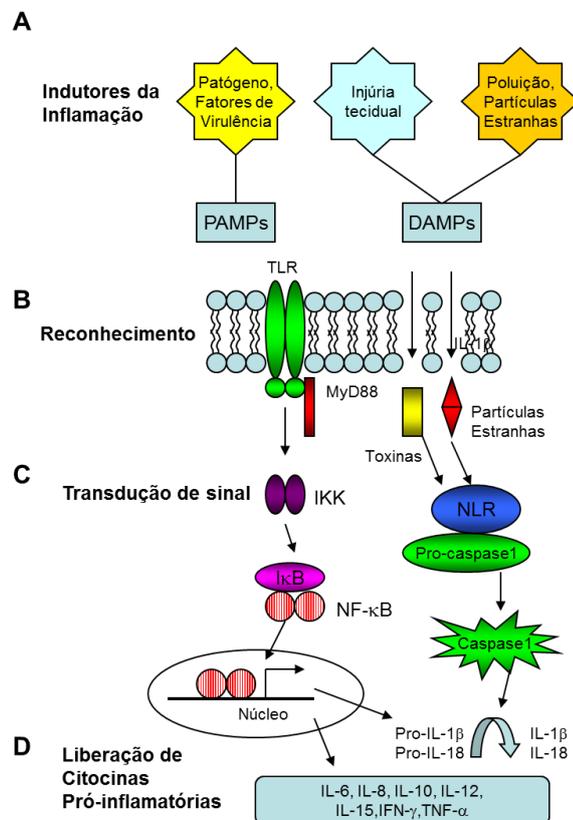
No entanto, para que os neutrófilos e outros leucócitos alcancem o foco inflamatório, eles precisam aderir e migrar por entre os espaços endoteliais até o local alvo, realizando a diapedese. Essa etapa depende da ação de moléculas de adesão, tais como as selectinas e integrinas, bem como outros fatores quimiotáticos e citocinas produzidas pela diversidade de células presentes no tecido acometido (PEPYS e HIRSCHFELD, 2003; BILATE, 2007).

Os neutrófilos, por sua vez, são importantes em diversas doenças inflamatórias de modo que a estimativa de sua quantidade no tecido inflamado pode ser útil como indicativo da gravidade do processo inflamatório. Isso faz com que este aspecto seja válido para verificar o efeito de novas abordagens capazes de alterar o processo inflamatório ou a migração dessas células para um foco inflamatório (BRADLEY *et al.*, 1982). Uma vez nos tecidos, os neutrófilos efetuam o processo de degranulação com a liberação da enzima mieloperoxidase (MPO). Este mecanismo faz parte de um eficiente e importante sistema de ação antimicrobiana presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (WINTERBOURN *et al.*, 1992; SEPE e CLARK, 1985). A MPO também exerce efeitos diretos sobre as células endoteliais, induzindo uma produção intracelular de substâncias oxidantes que contribui para o aumento do dano tecidual (ARATANI *et al.*, 1999; GUILPAIN *et al.*, 2008).

Após a maciça chegada dos neutrófilos, outras células mononucleares começarão a chegar no foco inflamatório, com destaque para os macrófagos. Eles são responsáveis por realizarem fagocitose e apresentação de antígenos, citotoxicidade celular, remoção de fragmentos celulares, remodelamento tecidual, regulação da inflamação, produção de diferentes mediadores químicos, dentre outros (AL-SARIREH e EREMIN, 2000). Os monócitos circulantes recrutados para a área de inflamação, atraídos por fatores quimiotáticos, aderem ao endotélio vascular e invadem o tecido transformando-se em macrófagos teciduais, que serão ativados. Esta ativação pode ser em decorrência da via não-imunológica (por meio de endotoxina, fibronectina e mediadores químicos) ou através da via imunológica (pela presença de linfócitos T (LT) ativados, que produzem citocinas como o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). A ativação macrocitária pode causar lesão tecidual, através da produção de metabólitos tóxicos de oxigênio, proteases, fatores quimiotáticos dos neutrófilos, fatores de coagulação, metabólitos do ácido aracdônico e óxido nítrico (NO) (COUSSENS e WERB, 2002).

Ainda com relação aos macrófagos, cabe ressaltar que a presença de micro-organismos ou de danos às células do hospedeiro fornece padrões moleculares associados à patógenos ou a danos (PAMPs e DAMPs, respectivamente) capazes de promover a estimulação dos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), presentes em fagócitos da imunidade inata, especialmente nos macrófagos. Dentre os PRRs mais investigados destacam-se os receptores do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll like receptor*) e os receptores do tipo Nod (NLR, do inglês *Nod like receptor*).

Juntos, tais receptores são capazes de ativar a via do fator nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) que induzirá a produção e liberação de diversas citocinas como demonstrado na figura (Figura 3). Este mecanismo que funciona pela liberação de mediadores inflamatórios como as interleucinas (IL) 1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), dentre outras, bem como por ativação celular é um dos responsáveis pela amplificação da resposta inflamatória (ASHLEY *et al.*, 2012; MEDZHITOV, PRESTON e JANEWAY, 1997).



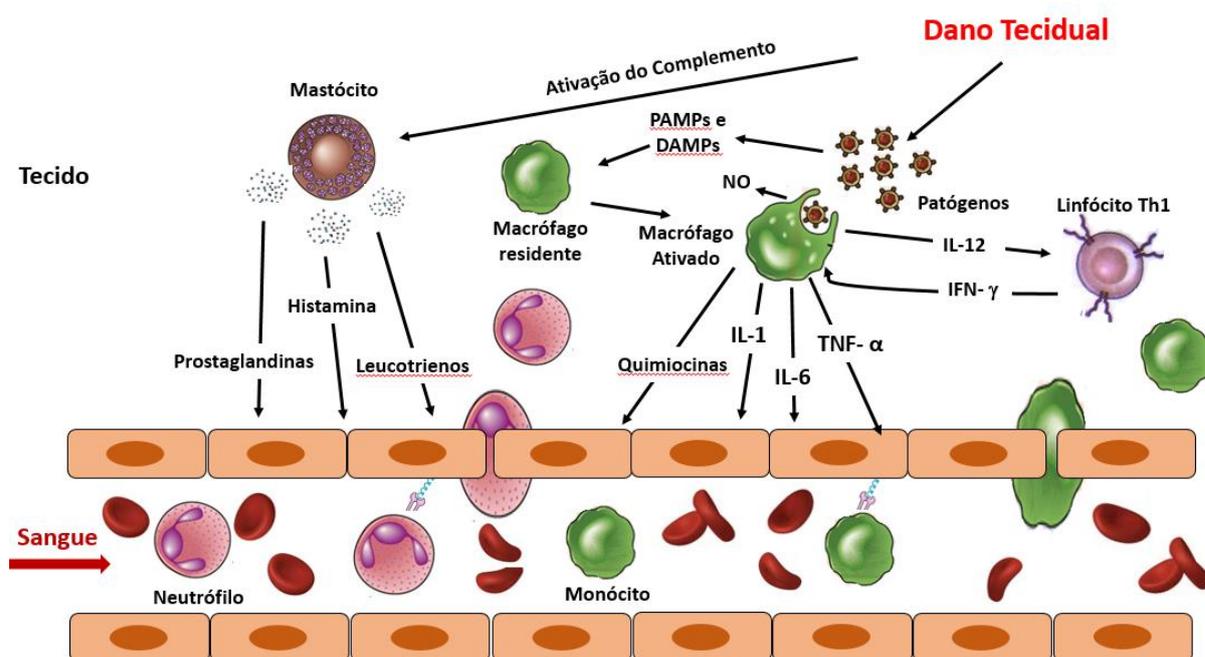
**Figura 3: O processo inflamatório. (A) Patógenos, injúria tecidual, e partículas estranhas são fontes de PAMPs e DAMPs que iniciam a inflamação. (B) Os TLRs e os NLRs se ligam aos PAMPs e DAMPs, respectivamente. (C) Os TLRs ativam uma via de transdução de sinal que envolve a fosforilação de I $\kappa$ B, liberando o fator de transcrição NF- $\kappa$ B que se transloca para o núcleo, onde ocorre a transcrição de genes inflamatórios. Os NLRs sinalizam através da formação do inflamassoma, que ativa a caspase-1 para converter as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 em suas formas ativas. (D) Uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas são produzidas e liberadas para promover as funções efetoras de inflamação (Fonte: Adaptada de ASHLEY *et al.*, 2012).**

Além das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , fundamentais para a iniciação do processo inflamatório, os macrófagos ativados também são produtores de outras

citocinas, tais como a IL-10, IL-12, IFN- $\alpha$ , IL-15, IL-18, IL-23 e IL-27 (DUQUE e DESCOTEAUX, 2014). Um pouco mais sobre a função destas substâncias nas doenças de cunho inflamatório será abordado adiante. Sob o controle destas citocinas, a reação inflamatória aguda é disparada e seguida por uma resposta sistêmica conhecida como resposta de fase aguda (RFA). A RFA é caracterizada por febre, produção de diferentes tipos de hormônios, leucocitose e síntese de proteínas em série, que é regulada, rapidamente, nos hepatócitos (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003; BILATE, 2007). Entre as proteínas da RFA, a proteína C-reativa (PCR) destaca-se pelo seu nível sérico que aumenta cerca de mil vezes durante este fenômeno. Esta proteína liga-se a uma variedade de agentes patogênicos e ativa as proteínas do sistema do complemento, favorecendo a fagocitose e destruição dos mesmos. A produção de PCR é parte da resposta de fase aguda não específica da maioria das inflamações, infecções e danos teciduais (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003; BILATE, 2007; VOLP *et al.*, 2008).

Para Nathan (2002), a fase aguda da inflamação pode ser resumida em um rápido influxo de granulócitos circulantes do sangue periférico para o local da inflamação, sobretudo os neutrófilos, seguidos de monócitos que, por sua vez, amadurecem em macrófagos inflamatórios, proliferam, produzem mediadores inflamatórios e assim, afetam as funções das células teciduais residentes. Este processo é o grande responsável pelo surgimento dos sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, edema e dor.

Uma vez que todos os esforços presentes na inflamação aguda são capazes de eliminar o estímulo nocivo inicial, a reação inflamatória tende a diminuir até seu desaparecimento, tendo a IL-10, outra citocina secretada por macrófagos, relevante atuação no declínio da resposta imune (LOBO-SILVA *et al.*, 2016). Durante este declínio, os granulócitos são eliminados e os macrófagos e linfócitos regridem em quantidade voltando a seus fenótipos pré-inflamatórias normais. O resultado usual da reação inflamatória aguda é a resolução bem-sucedida e a reparação de danos nos tecidos (RICCIOTI e FITZGERALD, 2011). Todas as etapas que envolvem a resposta imune inata estão representadas na figura abaixo (Figura 4).



**Figura 4: Etapas da inflamação aguda.** A inflamação aguda inicia-se com componentes da imunidade inata onde a lesão do tecido libera neuropeptídeos que atuarão sobre os mastócitos. A histamina liberada por estas células causa a vasodilatação inicial que permite a chegada das primeiras células, os neutrófilos, que realizam a diapedese para o foco em questão atraído pelos primeiros mediadores inflamatórios produzidos. Em seguida, observa-se a chegada de monócitos que se transforma em macrófagos ativados pelo reconhecimento de PAMPs ou DAMPs no tecido, produzindo óxido nítrico e outras diversas citocinas importantes para a amplificação da resposta inflamatória que culmina com o dano tecidual e possível destruição do agente agressor. O macrófago, além disso, pode ativar a imunidade adquirida se não houver a resolução do processo inflamatório.

Entretanto, uma inflamação aguda não resolvida pode evoluir para um quadro inflamatório crônico. Este também pode se desenvolver insidiosamente durante um período de meses sem aparecimento de manifestações clínicas. Na inflamação crônica existe uma forte participação da imunidade adaptativa, principalmente representada por linfócitos T do fenótipo *helper* ( $T_H$ ) 1. Estas células são grandes produtoras de interferon-gama ( $IFN-\gamma$ ), uma citocina extremamente importante na ativação dos macrófagos (MURDOCH e LLOYD, 2010).

Deste modo, a persistência e a disfunção da resposta inflamatória levam a formação de cicatrizes e consequente perda de função dos órgãos acometidos (OSCHMAN, CHEVALIER, BROWN, 2015). Diante do exposto, compreende-se o fato de que a inflamação aguda, se não ocorrer de modo perfeito e equilibrado, pode

predispor ao surgimento de inflamação crônica, potencializando o aparecimento de doenças relacionadas à autoimunidade e a displasias, bem como ao dano tecidual (SCHOTEENFELD e DIMMER, 2006). Assim, as características histopatológicas da inflamação crônica incluem a predominância, sobretudo de linfócitos, proliferação de pequenos vasos sanguíneos estruturalmente heterogêneos e hiperpermeáveis, fibrose e necrose (SCHOTEENFELD e DIMMER, 2006).

Cabe ainda ressaltar que a inflamação crônica é uma condição médica onde o processo inflamatório descontrolado faz com que haja a formação de novo tecido conjuntivo devido aos danos causados ao tecido inflamado. A destruição tecidual ocorre principalmente devido a ação dos macrófagos ativados, conforme descrito anteriormente, além da presença de fibrose, uma característica marcante deste tipo de inflamação. A fibrose está relacionada a capacidade de os macrófagos produzirem fatores de crescimento (ex. fator de transformação do crescimento-beta (TGF- $\beta$ )), citocinas fibrinogênicas, fatores de angiogênese (FGF) e colagenases de remodelamento (ALLISON *et al.*, 1978; LUNESHI, ROTHWELL, BROUGH, 2009).

Além das substâncias produzidas por macrófagos, outras moléculas também contribuem para o dano tecidual na condição crônica. Dentre elas, merecem destaque as proteínas do Sistema do Complemento e as proteínas de fase aguda. Células necróticas oriundas do tecido inflamado também podem, por exemplo, iniciar a cascata inflamatória, ativando os sistemas das cininas, coagulação e fibrinolítico e liberando mediadores pelos leucócitos responsivos ao tecido necrótico. A inflamação crônica, no geral, tem a participação de vários tipos de componentes e células, como os linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos (MOGENSEN, 2009; SARMA e WARD, 2011).

Diante do exposto, observa-se que a presença de macrófagos no tecido é mantida desde a fase aguda até a crônica, fato este possível devido ao recrutamento de monócitos do sangue periférico (que no tecido se tornam macrófagos), além da proliferação e imobilização locais, sendo o primeiro mecanismo o mais importante. Os macrófagos podem ser vistos, portanto, como fundamentais para a manutenção e amplificação da resposta inflamatória por meio da apresentação de antígenos, produção de NO, de citocinas e quimiocinas, além da emissão de segundos sinais, especialmente por meio das moléculas coestimuladoras (PODOJIL e MILLER, 2010). Devido a isso, estas células são importantes alvos para o controle dos processos inflamatórios (CHEN *et al.*, 2015).

### 2.1.1.1 Óxido Nítrico no contexto da inflamação

O NO é uma pequena molécula sintetizada por diferentes tipos de células em vários tecidos. Exerce múltiplas funções fisiológicas dentre as quais está a participação na resposta contra patógenos, controle da pressão arterial, da circulação sanguínea, da função das plaquetas e ainda, da neurotransmissão no SNC e nervos periféricos (BOGDAN, ROLLINGHOFF e DIEFENBACH, 2000).

De acordo com Mao *et al.* (2013), este composto é derivado de átomos de nitrogênio da guanidina e de oxigênio molecular que participam de uma reação catalisada pela enzima NO sintase (NOS). Dependendo do tipo de células que a produz, a NOS pode ser classificada em neuronal (nNOS ou NOS1) e endotelial (eNOS ou NOS2), ambas responsáveis pela produção de NO com funções fisiológicas, importantes para a manutenção da homeostasia. A forma induzível da NO sintase, denominada iNOS ou NOS3 é ativada por estímulos imunológicos, tais como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e lipopolissacarídeo (LPS). A supressão desta enzima pode ser feita pela ação de TGF- $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-10 e por glicocorticoides (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

Segundo Salvemini *et al.* (1996), o NO é um potente vasodilatador e um dos seus envolvimento na resposta inflamatória está relacionado com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. No entanto, a participação do NO na resposta imunológica vai além da atividade vasodilatadora, incluindo o controle de infecções e sinalização de cascatas reguladoras, fatores de transcrição, resposta vascular, migração e rolamento de leucócitos, produção de citocinas e diferenciação de células T (MAO *et al.*, 2013).

A capacidade microbicida e tumoricida do NO é decorrente do fato de esta pequena molécula tratar-se de um radical livre produzido pelo metabolismo da L-arginina (JAMES, 1995). MacMiking, Xie e Nathan (1997) descreveram a participação do NO na função dos macrófagos, em especial, como um produto citostático ou citotóxico contra vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e células tumorais. Além da forma radicalar, outras formas podem ser encontradas como o cátion nitrosônio (NO<sup>+</sup>) e ânions nitroxila (NO<sup>-</sup>) que também são capazes de causar danos celulares. Isso ocorre porque todas estas formas são facilmente penetráveis na membrana plasmática e assim causam a peroxidação lipídica, interagem com íons de

metais de transição e formas redox do oxigênio, bem como grupamentos tiol e outros centros nucleofílicos presentes em enzimas vitais das células (JAMES, 1995). Diante deste potencial destrutivo, o limite de concentração que separa este mensageiro da não-toxicidade às células do hospedeiro e da toxicidade necessária para ação antimicrobica é tênue. Por isso, observa-se que nas doenças autoimunes e situações de sobrecarga exageradas do organismo, o NO encontra-se em concentrações aumentadas, tóxicas para o organismo (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

Para Cuzzocrea (2006), radicais livres, sobretudo espécies reativas do oxigênio (EROs) e NO, podem funcionar como mediadores da inflamação e/ou destruição de tecidos em doenças inflamatórias. Tais reagentes são capazes de induzir a morte celular por necrose e por isso, em alguns casos, a diminuição nos níveis de NO pode ser desejável, por minimizar o dano tecidual.

No que diz respeito à sinalização das cascatas reguladoras, destaca-se a influência do NO na via de sinalização da via do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Dependendo de alguns fatores, como concentração, estado redox, tipo de célula envolvida, dentre outros, o NO pode influenciar positiva ou negativamente na ativação de NF- $\kappa$ B (LAROUX *et al.*, 2001). Este mediador ainda é capaz de inibir a expressão de diferentes genes relacionados a doenças inflamatórias, como os relacionados às quimiocinas, citocinas, ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e moléculas de adesão (COLASANTI e PERSICHINI, 2000).

Além disso, sabe-se que em ambos os processos inflamatórios, agudo ou crônico, o NO exerce grande influência fisiopatológica, alterando a expressão de moléculas de adesão como a ECAM (cuja expressão, em parte, é relacionada à ativação da via NF- $\kappa$ B) e P-selectinas. Com isso, a interação entre leucócitos e endotélio e a infiltração de leucócitos no tecido inflamado pode ser potencializada na presença de NO (LAROUX *et al.*, 2001).

### **2.1.2 Imunidade adquirida e o surgimento de um processo inflamatório crônico**

A ativação da imunidade adquirida durante um processo inflamatório é marcada pela participação de linfócitos T e B (LB) caracterizando, respectivamente, a imunidade celular e humoral.

A imunidade celular é produzida pela atuação de diferentes subtipos de LT. Classicamente, os dois principais são os subtipos auxiliares ou helper ( $T_H$ ) e os citotóxicos (LTC), que apresentam as moléculas correceptoras CD4 ou CD8, respectivamente. Os LT CD4<sup>+</sup> ou  $T_H$  coordenam a resposta imune por meio da liberação de citocinas capazes de potencializar a ação de outras células (LB, macrófagos ou mesmo LT CD8<sup>+</sup>) visando a erradicação do agente estranho. Já o LTC está envolvido, principalmente, em respostas antivirais e antitumorais promovendo destruição celular direta pela liberação de enzimas citolíticas (CRUVINEL *et al.*, 2010). Ambos os tipos mencionados reconhecem o peptídeo antigênico apresentado pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) na superfície de uma célula apresentadora de antígeno (APC). O receptor de célula T (TCR) é expresso na membrana do LT em associação a um complexo denominado CD3, onde o TCR é responsável pelo reconhecimento do complexo peptídeo-molécula de MHC, e o CD3, pela sinalização celular subsequente. Se o MHC for do tipo I, apresentará afinidade pelo TCD8<sup>+</sup> e se for do tipo II, pelo TCD4<sup>+</sup>. Este complexo será responsável pela geração do primeiro sinal (SOUZA *et al.*, 2010).

Contudo, o funcionamento normal do sistema imunológico envolve uma série de interações altamente complexas. Embora os tumores e patógenos expressem antígenos que são reconhecíveis pelo sistema imunológico, a apresentação de antígeno *per se* não é suficiente para iniciar uma resposta imunológica. A ativação de células T é modulada por sinais estimuladores e inibitórios que trabalham em conjunto para coordenar a resposta do sistema imunológico a uma ameaça. As moléculas de superfície celular CD28 e CTLA-4 proporcionam sinais moduladores positivos (CD28) e negativos (CTLA-4) nos estádios iniciais de uma resposta imunitária (WOLCHOK e SAENGER, 2008).

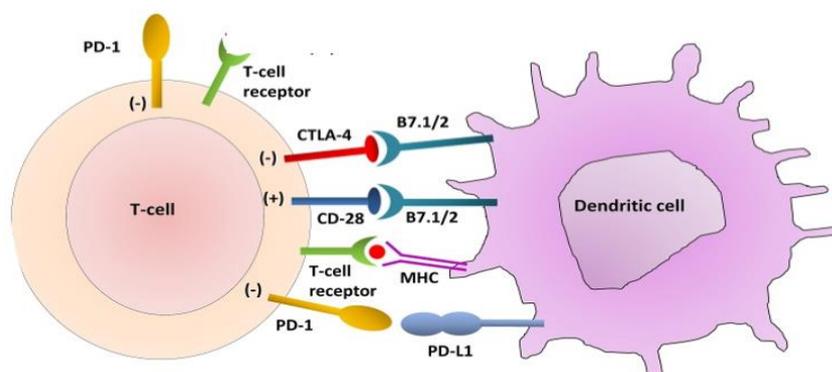
A molécula CD28, presente na superfície dos LTs interage com as moléculas da família B7 (CD80 e CD86), expressas na superfície de APCs. Na presença de patógenos, as APCs são ativadas e aumentam a expressão das moléculas B7, em nível suficiente para fornecer o sinal secundário. Esta interação estimula as APCs a produzirem IL-12 que, por sua vez, estimula a ativação de linfócitos, amplificando a resposta inflamatória (PODOJIL e MILLER, 2010).

A inibição do LT pode ser promovida pela ligação de uma molécula competidora das moléculas coestimulatórias da família B7. Em determinadas condições, as APCs passam a expressar a molécula CTLA-4 (CD152), que tem maior

afinidade ao CD28 que as moléculas B7 (CD86 e CD80). No entanto, ao contrário dessas últimas, a CTLA-4 tem ação inibitória sobre os LT, induzindo a apoptose (PODOJIL e MILLER, 2010; DUQUE e DESCOTEAUX, 2014). Assim, o CTLA-4 desempenha um papel crítico na regulação negativa de respostas imunes ativadas por antígeno (AYUKAWA *et al.*, 2004). Esta molécula é encontrada em compartimentos intracelulares e não é expressa em quantidades detectáveis a menos que o LT seja ativado. As funções de CTLA-4 consistem no envio de um sinal inibitório para o LT afetando sua taxa de divisão celular, bem como podendo promover a apoptose das mesmas (GRIBBEN *et al.*, 1995; WOLCHOK e SAENGER, 2008). Também presente em LB, o CTLA-4 quando ativado nestas células diminui o padrão de resposta, com redução da produção de anticorpos, principalmente (SAGE *et al.*, 2014).

Outra molécula importante é a denominada como de morte celular programada-1 (PD-1) (CD279). Em situações de inflamação crônica, vários tipos de células da imunidade (LB, LTCD4+, LTCD8+, NK, macrófagos e células dendríticas), começam a expressar altos índices de PD1 que, ao interagir com seu ligante PD-L1 ou -L2, promove a supressão da célula levando ao declínio da resposta imune. Em macrófagos, a ativação da via NF- $\kappa$ B está diretamente relacionada a regulação da expressão de PD-1. Além disso, este mecanismo tem sido relacionado a evasão de células tumorais à resposta imune (BALLY *et al.*, 2015).

Na figura 5 estão representadas estas importantes moléculas que atuam na regulação da atividade dos linfócitos.



**Figura 5: Sinal primário e secundário envolvido na ativação de uma célula T.**

Na figura estão esquematizadas importantes moléculas presentes nas células T e nas células apresentadoras de antígeno que fornecem o sinal primário para ativação do LT (MHC-TCR) e os sinais secundários que podem ser positivos (B7-CD28) ou negativos (B7-CTLA-4 e PD1-PD1-L). Fonte: Adaptado de Zaravinos (2014).

Uma vez ativados, dependendo do ambiente de citocinas em que o antígeno for apresentado para o LT CD4<sup>+</sup>, este poderá se diferenciar em alguns subtipos, cada qual com uma atividade peculiar. Até o momento, os subtipos de L<sub>T</sub>H melhor estudados são L<sub>T</sub>H1, L<sub>T</sub>H2, L<sub>T</sub>H17 e LT regulatório (Treg). Apesar de morfologicamente idênticos, o funcionamento destes linfócitos é bastante distinto no que diz respeito às citocinas secretadas e o tipo de resposta articulada. O perfil T<sub>H</sub>1 é induzido pela apresentação de antígenos em um ambiente rico em IL-12 e IL-18, ambas citocinas produzidas por macrófagos ativados. Uma vez diferenciados para o perfil T<sub>H</sub>1, as principais citocinas secretadas por estes linfócitos serão IFN- $\gamma$  e IL-2. O objetivo deste perfil é recrutar diferentes populações celulares, em especial fagócitos mononucleares, que auxiliam na destruição de patógenos intracelulares, mas que também podem produzir autoimunidade (SOUZA *et al.*, 2010).

Sobre o perfil T<sub>H</sub>2, destaca-se sua atuação no combate a patógenos extracelulares como os helmintos e em processos alérgicos. A diferenciação T<sub>H</sub>2 dá-se em um ambiente rico em IL-4 e as citocinas produzidas por células deste perfil são IL4, IL5, IL9, IL13, IL10 e IL25. A IL-4 produzida por estes LT induzem o LB a produzirem IgE, um anticorpo chave nos processos alérgicos por promover a degranulação de mastócitos, basófilos (LUCKEERAM *et al.*, 2012).

Caracteristicamente, as citocinas do perfil T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2 direcionam para o desenvolvimento de sua respectiva via e inibem a expressão do padrão oposto. As citocinas chaves neste processo são IFN- $\gamma$  (T<sub>H</sub>1) e IL-4 (T<sub>H</sub>2), de modo que uma vez polarizada a resposta imune para o padrão T<sub>H</sub>1, a via T<sub>H</sub>2 será inibida e vice-versa. Isso ocorre devido à regulação do nível de receptores de membrana, da expressão diferencial de fatores de transcrição e de mudanças epigenéticas (SOUZA *et al.*, 2010).

A polarização para o perfil T<sub>H</sub>17 exige pelo menos três etapas de diferenciação do T<sub>H</sub>0 que incluem a fase de diferenciação mediada por TGF- $\beta$  e IL-6, a fase de auto-amplificação por IL-21 e a fase de estabilização por IL-23. As principais citocinas deste perfil T<sub>H</sub>17 são IL-17 e IL-21. Ao contrário dos mecanismos de diferenciação T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, nos quais suas respectivas citocinas principais IFN- $\gamma$  e IL-4 atuam como amplificadoras, a citocina principal IL-17 da célula T<sub>H</sub>17 não amplifica sua diferenciação, mas a citocina IL-21, que em colaboração com TGF- $\beta$  amplifica a diferenciação T<sub>H</sub>17. Este perfil está intrinsecamente envolvido com o desenvolvimento

e manutenção de diversas doenças autoimunes (KORN *et al.*, 2007; NUTRIEVA *et al.*, 2007).

As células Treg, por sua vez, desempenham um papel fundamental na manutenção da tolerância a antígenos próprios. Após a depuração de patógenos, há uma regulação negativa na resposta imune, protegendo assim contra imunopatologias. As citocinas efetoras principais deste perfil incluem IL10 e TGF- $\beta$  que suprimem também a produção de IgE, mostrando assim o seu papel importante na atenuação da inflamação alérgica (LUCKEERAM *et al.*, 2012).

As respostas imunes efectoras desreguladas ou exacerbadas contribuem para o desenvolvimento de doenças alérgicas e autoimunes. As células T<sub>H1</sub> são potencialmente pró-inflamatórias e têm sido associadas à indução e progressão de doenças autoimunes, bem como as T<sub>H17</sub>, de modo que podem ser alvos da terapia farmacológica nestes casos (SOUZA *et al.*, 2010).

Por fim, a imunidade humoral consiste na secreção de anticorpos pelos LB que podem ser ativados de forma independente ou dependente de LT. No primeiro modo, o LB pode ser estimulado em ausência de LT por moléculas usualmente não proteicas, poliméricas e que estimulam a produção de imunoglobulinas (Ig) de baixa afinidade, sobretudo, IgM. Nesta situação onde há ausência de LT, não são geradas as citocinas que permitem a troca de classe das Ig, maturação de afinidade ou formação de LB de memória. Já na ativação LT dependente, a resposta se dá contra antígenos proteicos e requer que os LT *helper* também o reconheça para que atue de modo cooperativo ao LB estimulando sua expansão clonal, a mudança de classe das (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) e a maturação da afinidade das imunoglobulinas e a diferenciação em LB de memória. Esta interação é possível por meio de moléculas coestimuladoras que as células B expressam em sua superfície. Assim, os LT expressam o CD40L que interagem com CD40, presente na superfície de LB, além de CD28 cujos ligantes são B7-1 e B7-2 já mencionados, que aumentam sua expressão na superfície de LB ativados. Esses dois pares de moléculas (CD40/CD40L e CD28/B7) geram a produção de sinais estimulantes e induzem a produção de diversas citocinas (CRUVINEL *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Ação anti-inflamatória do Resveratrol

Apesar de o mecanismo de ação do resveratrol ainda não estar completamente elucidado, o potencial benéfico deste composto sobre diversas doenças inflamatórias tem sido frequentemente demonstrado. Testes *in vivo* evidenciaram que o resveratrol é capaz de inibir a atividade das enzimas COX, cruciais na produção de diversas moléculas pró-inflamatórias e que, geralmente, são alvos de AINES (KHANDUJA, BHARDWAJ e KAUSHIK, 2004; AFAQ, ADHAMI e AHMAD, 2003; AZIZ, AFAQ e AHMAD, 2004).

Além disso, o composto é capaz de atuar modulando a função de receptores celulares, genes inflamatórios e fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B, fortemente envolvido no processo inflamatório. Neste sentido, estudos demonstraram que o resveratrol pode inibir edemas crônicos ou agudos induzidos quimicamente (JANG *et al.*, 1997; BOHM, ROSENKRANZ e LAUFS, 2004), reduzir a inflamação das vias aéreas (BIRREL *et al.*, 2005) e a osteoartrite (ELMALI *et al.*, 2005), ajudando também a evitar a rejeição de enxertos (WU *et al.*, 2005a; WU *et al.*, 2005b), entre outras. Soma-se às ações já mencionadas uma importante atuação do resveratrol na artrite reumatoide por ser capaz de suprimir a proliferação celular, induzir apoptose via caspase-3, além de exercer função protetora nos condrócitos contra injúrias oxidativas (ELMALI *et al.*, 2007; DAVE *et al.*, 2008).

Considerando as funções do sistema imunológico e sua homeostasia, a atividade de NF- $\kappa$ B parece desempenhar um papel crucial tanto na inflamação aguda quanto crônica, e sua função aberrante poderia ser uma das principais causas de doenças autoimunes e câncer (SVAJGER e JERAS, 2012). De maneira geral, Meyer, Schreck e Baeuerle (1993) demonstraram em culturas de células que compostos antioxidantes como o resveratrol são potenciais inibidores da ativação de NF- $\kappa$ B. Neste sentido, Kumar e Sharma (2010) encontraram em ratos tratados com resveratrol uma diminuição da expressão de p65 que, junto com p50, forma um dos principais heterodímeros de NF- $\kappa$ B, bem como uma discreta diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e COX-2. Ren *et al.* (2013) obtiveram resultados semelhantes, demonstrando que o resveratrol reduziu a atividade de transcrição de p65. Além disso, o resveratrol inibiu a degradação da proteína I $\kappa$ B- $\alpha$ , que precisa ser liberada do complexo com NF- $\kappa$ B para que este migre para o núcleo e exerça sua regulação gênica pró-inflamatória.

Deste modo, observa-se que o resveratrol suprimiu de forma eficaz a sinalização de NF- $\kappa$ B através da inibição de suas atividades e da quinase I $\kappa$ B.

Outros resultados neste mesmo sentido foram encontrados por Fordham, Naqvi e Nares (2014) onde o resveratrol foi capaz de diminuir a produção das citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IFN- $\gamma$ , produzidas por células mononucleares do sangue periférico na presença de estímulo. As propriedades anti-inflamatórias deste composto também se estende à diminuição da produção de quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5. A redução nestas quimiocinas impacta, particularmente, no recrutamento de monócitos e de neutrófilos para os locais de inflamação. Ainda de acordo com os autores, os níveis de G-CSF e GM-CSF, que promovem diferenciação mielóide e potencializam a ativação do sistema imune, também foram reduzidos.

Além disso, o resveratrol já foi associado à redução na expressão de moléculas coestimuladoras presentes nas APCs, como CD40, CD80 e CD86, e ainda MHC I e MHC II (KIM *et al.*, 2002; SAITO *et al.*, 2005; SVAJGER, OBERMAJER e JERAS, 2010). Portanto, o resveratrol pode proporcionar uma nova abordagem para o tratamento de doenças associadas a inflamação e câncer.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório de compostos análogos do resveratrol.

### 2.2.2 Específicos

#### - Análises *in vitro*

- Selecionar os análogos mais promissores por meio da análise da viabilidade de células RAW 264.7.
- Determinar a LC<sub>50</sub> dos análogos selecionados em células RAW 264.7.
- Determinar a ação antioxidante dos análogos.
- Avaliar o potencial anti-inflamatório dos análogos através da dosagem de óxido nítrico, citocinas e quimiocina.
- Determinar a influência dos análogos na expressão das moléculas MHCII, CD80 e CD86.
- Determinar a influência dos análogos na proliferação celular de esplenócitos estimulados.
- Determinar a influência dos análogos na expressão da molécula CTLA-4 em esplenócitos estimulados.

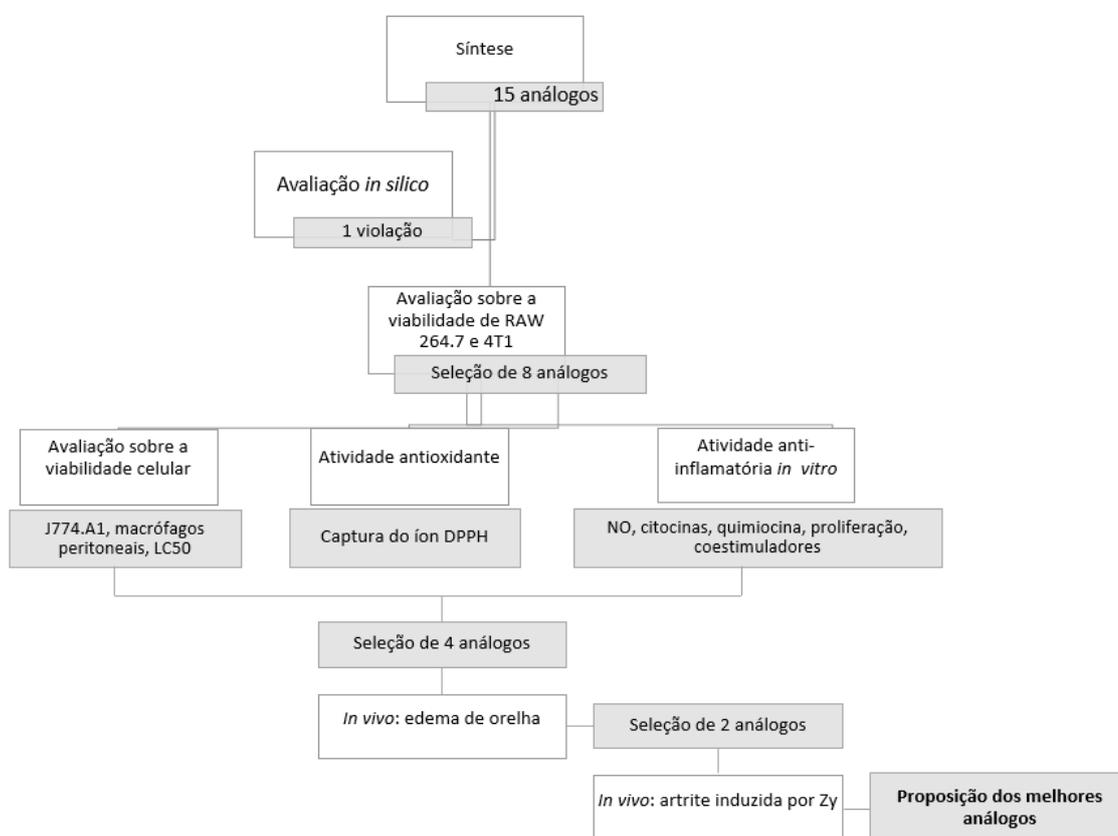
#### - Análises *in vivo*

- Avaliar o potencial anti-inflamatório dos análogos mais promissores em modelo murino de edema de orelha.
- Avaliar o potencial anti-inflamatório dos análogos mais promissores em modelo murino de artrite.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1 Delineamento experimental

Foram realizados uma série de ensaios, partindo da análise *in silico* e seguindo para testes *in vitro*, que direcionaram a escolha dos análogos com maiores potenciais anti-inflamatório para serem submetidos aos devidos testes *in vivo*. Na figura 6 está representado um fluxograma com os ensaios anti-inflamatórios realizados.



**Figura 6: Delineamento experimental com as etapas realizadas para direcionamento dos análogos empregados nos ensaios *in vivo*.**

Os ensaios *in vitro* foram organizados em duas etapas. A primeira etapa constituiu na avaliação em ensaios de triagem com os 15 análogos para a seleção daqueles com menor influência na viabilidade de RAW 264.7. Para isso, foram

utilizadas três concentrações do resveratrol e dos análogos sendo possível analisar quais os compostos mais promissores e a concentração de trabalho mais eficaz para os mesmos. De forma complementar, verificou-se a viabilidade de outras linhagens celulares expostas aos análogos (macrófagos peritoneais e J774.A1) e determinou-se a concentração letal para 50% (LC<sub>50</sub>) da população de células RAW 264.7. Com base nestes resultados, foi feita a primeira triagem dos análogos, sendo selecionados 8 deles.

Já a segunda etapa foi realizada apenas com os análogos selecionados e consistiu na determinação da atividade antioxidante dos compostos; influência na produção de mediadores inflamatórios, expressão de moléculas coestimuladoras e no índice de proliferação celular. Os resultados oriundos dos ensaios mencionados foram direcionadores para a seleção dos quatro análogos com maior potencial anti-inflamatório. Os ensaios *in vivo* foram realizados, portanto, com estes análogos sendo o primeiro modelo o de edema de orelha que permitiu a seleção dos dois análogos mais promissores que foram os mesmos testados no modelo de artrite induzida por zymosan, como forma de confirmar seu potencial anti-inflamatório.

### **2.3.2 Preparo dos análogos e do resveratrol**

As substâncias foram dissolvidas em uma solução de etanol P.A. (VETEC) e, em seguida, em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI-1640) (GIBCO) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico contendo penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO), de modo que a concentração final máxima de etanol utilizada nos ensaios foi de 0,1%.

### **2.3.3 Linhagens celulares**

Nos ensaios de avaliação da viabilidade (citotoxicidade indireta) e produção de mediadores inflamatórios foram utilizados macrófagos murinos das linhagens RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) e J774.A1 (ATCC® TIB-67), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar e Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira, respectivamente. Além disso, também foram utilizadas culturas primárias de macrófagos peritoneais e de esplenócitos oriundos de camundongos C57BL/6.

### 2.3.4 Culturas de células

As linhagens RAW 264.7 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (SARSTEDT) com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico e mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As células J774.A1 foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (SARSTEDT) com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) acrescido de 10% de SFB e 1% de antibiótico, assim como a linhagem MCF-7, embora para estas células tenha sido adicionado 1% de insulina. Ambas foram cultivadas em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

A cada dois ou três dias, realizou-se a troca do meio de cultura, monitorando as células até alcançarem confluência de aproximadamente 80%, quando então foram congeladas usando-se meio apropriado de congelamento (90% SFB, 10% DMSO, VETEC), transferidas para garrafas maiores (75 cm<sup>3</sup>, SARSTEDT) ou ainda utilizadas nos ensaios.

Uma vez que as linhagens celulares utilizadas são aderentes, para sua remoção do interior das garrafas utilizou-se um suporte plástico (*cell scraper* – SARSTED) para RAW 264.7 e J774.A1.

### 2.3.5 Animais experimentais

Para os experimentos *in vivo* de edema de orelha foram utilizados camundongos da linhagem BALB/C. Para os ensaios *in vivo* de artrite induzida por Zymosan e ensaios *in vitro* (uso de macrófagos peritoneais e esplenócitos) foram empregados camundongos da linhagem C57BL/6. Todos os animais utilizados foram fêmeas, clinicamente saudáveis, de idade entre 8 e 10 semanas fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF. Durante todo o estudo, esses animais foram mantidos no biotério do laboratório de Imunologia, alimentados com ração industrial e água *ad libitum*, com ciclo claro/escuro de 12 horas.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFJF de acordo com os protocolos 027/2013, 031/2016 e 045/2016.

### 2.3.6 Influência dos análogos do resveratrol na viabilidade de células RAW 264.7 e J774.A1

A influência dos análogos do resveratrol na viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT ((brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), um teste colorimétrico que quantifica a redução do reagente MTT em um composto roxo, conhecido como formazan, por meio da ação de desidrogenases mitocondriais. A presença destas enzimas ativas é um indicativo de viabilidade celular (RISS *et al.*, 2013). Esta técnica pode ser utilizada como uma medida indireta da citotoxicidade ou diminuição das funções metabólicas celulares induzida por diferentes fatores, haja vista que está diretamente relacionada à uma função bioquímica crítica que é a atividade mitocondrial (MOSMAN, 1983; RISS *et al.*, 2013).

Além da realização deste teste com células RAW 264.7, foi imprescindível incluir a linhagem J774.A1 uma vez que esta foi utilizada para verificar a influência dos análogos na produção de IL-1 $\beta$  já que, de acordo com Pelegrin *et al.* (2008), as células RAW 264.7 são deficientes na proteína ASC e, devido a isso, não são capazes de processar a pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$ .

Assim, para determinar a influência em sua viabilidade, células RAW 264.7 e J774.A1 foram cultivadas até atingir a confluência necessária e removidas conforme previamente descrito. Em seguida, estas células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán (Sigma), e transferidas para placas de 96 poços de fundo chato, na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço. Esta concentração foi adaptada do estudo de Huo *et al.* (2012). As células foram então incubadas por 24 horas antes da realização dos passos seguintes.

A segunda etapa do ensaio consistiu na remoção do meio de cultura presente, com consequente retirada de células mortas, e adição de 200  $\mu$ L de meio de cultura suplementando (2% de SFB e 1% de antibiótico) contendo as substâncias a serem testadas em três diferentes concentrações (10, 25, 50  $\mu$ M) em triplicata. Todas as placas continham controles não tratados (apenas meio de cultura) e controle do solvente utilizado no preparo das substâncias, o etanol, nas concentrações de 0,1%.

Após 24h de incubação para as células J774.A1 e 48 horas para RAW 264.7, o sobrenadante foi removido e adicionada uma solução de meio de cultura contendo 10% (v/v) do reagente MTT (5 mg/mL, Invitrogen), a qual foi plaqueada no volume de

100 µL/poço. A placa foi incubada por um período de 2 horas e 30 minutos em estufa incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (RISS *et al.*, 2012). Ao final deste intervalo, o sobrenadante foi descartado e o cristal de formazan foi ressuspensionado em DMSO, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) a 595 nm. O ensaio foi realizado três vezes em triplicata.

Para fins de cálculo do percentual de células viáveis expostas ao tratamento, usou-se como referência o controle não tratado (meio) que foi considerado como tendo 100% de viabilidade celular. Além de comparados com o meio, os análogos foram avaliados de acordo com a ISO10993-5:2009 que estabelece que a viabilidade celular não deva ser reduzida a valores inferiores a 70% no que diz respeito a investigação de citotoxicidade de substâncias *in vitro*.

### **2.3.7 Influência dos análogos do resveratrol na viabilidade de cultura primária de macrófagos peritoneais**

Para extração de macrófagos peritoneais e esplenócitos foram utilizados quatro camundongos da linhagem C57BL/6.

A indução dos macrófagos foi realizada pela injeção intraperitoneal de 2 mL de tioglicolato 3% estéril (GORDON, UNKELESS e COHN, 1974). Após 4 dias, os animais foram eutanasiados para a realização de uma lavagem peritoneal onde 5 mL de tampão fosfato-salino (PBS) gelado foram injetados e, em seguida, recolhidos com seringa. O líquido coletado do peritônio foi acrescido de PBS estéril até o volume final de 10 mL e submetido à centrifugação a 600g, por 10 minutos. As células obtidas foram ressuspensionadas em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5% de SFB e 1% de antibiótico. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer com corante azul de tripan.

Os macrófagos foram então semeados em placas de 96 poços de fundo chato na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço (SARSTEDT) (adaptado de PARK *et al.*, 2014). Para aderência, as células foram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, quando então foram lavadas com PBS estéril. A seguir, foi adicionado meio de cultura contendo as substâncias a serem testadas na concentração de 50 µM. Foram feitos controles não tratados (apenas meio de cultura) e controle do etanol 0,1% (v/v). As placas foram incubadas por mais 48 horas em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Ao final

deste tempo, realizou-se a análise da viabilidade celular pelo método de MTT, conforme descrito no item 4.4.2.

### **2.3.8 LC<sub>50</sub> dos análogos do resveratrol para RAW 264.7**

Foi determinada a concentração letal para 50% da população celular (LC<sub>50</sub>) para os análogos do resveratrol que corresponde quantidade de substância necessária para reduzir em 50% a viabilidade de células tratadas, comparando-se com células não tratadas.

Para fins de cálculo de LC<sub>50</sub>, foram realizados os ensaios de maneira idêntica a descrita acima (item 4.4.4) para a linhagem RAW 264.7. Após serem semeadas e aderirem à placa, as células foram expostas a 8 concentrações distintas de cada substância em teste (1000, 800, 400, 200, 100, 50, 25 e 10 µM) por 48h, quando foi aferida a taxa de viabilidade celular pelo método de MTT. Os dados foram tratados no *software* GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software Inc., EUA).

### **2.3.9 Avaliação da atividade antioxidante do resveratrol e seus análogos**

O método utilizado na avaliação da atividade antioxidante do resveratrol e seus análogos baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de antioxidante ou espécie radicalar, o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) que possui cor púrpura, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente diminuição da absorbância. A partir dos resultados é possível determinar a capacidade antioxidante ou sequestradora de radicais livres, bem como comparar o resultado com substâncias com relevante poder antioxidante (CALIL *et al.*, 2012). Esta técnica foi inicialmente proposta por Marco (1968), e neste ensaio foi utilizada a adaptação proposta por Calil *et al.* (2012).

As soluções das substâncias em teste foram preparadas utilizando-se etanol como solvente em uma faixa que contemplou oito concentrações diferentes entre 400 µM e 3,12 µM. Do mesmo modo, preparou-se a solução de DPPH na concentração 300 µM (120 µg/mL) que foi plaqueada em um volume de 150 µL em todos os poços que receberiam as substâncias testadas. Em seguida, foram adicionados 50 µL das

substâncias em suas diferentes concentrações. O poço utilizado como controle constava de 150 µL da solução de DPPH e 50 µL de etanol PA (solvente).

Após 30 minutos a placa de 96 poços foi lida em espectrofotômetro a 515 nm, sendo as leituras repetidas até total estabilização das absorbâncias.

O valor da concentração inibitória em que foi expresso o resultado representa a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do íon DPPH (IC<sub>50</sub>), calculado a partir da equação obtida na curva padrão para cada substância, onde a absorbância corresponde ao eixo Y e a diluição, ao eixo X.

### **2.3.10 Influência dos análogos do resveratrol no índice de proliferação celular de esplenócitos**

Para a avaliação da influência dos análogos do resveratrol no índice de proliferação de esplenócitos foi utilizada a técnica descrita por Sharma *et al.* (2007) com adaptações. Para isso, os baços foram extraídos de camundongos C57BL/6. Estes órgãos foram macerados em 10 mL de PBS utilizando-se peneiras de aço estéreis e, a seguir, centrifugados por 5 minutos a 600g, 4°C. O sobrenadante produzido foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium* - 1% KHCO<sub>3</sub> e 8% NH<sub>4</sub>Cl em água destilada) por 5 minutos, em temperatura ambiente, no intuito de promover a lise osmótica dos eritrócitos. Ao término desta etapa, 28 ml de PBS foram acrescentados e seguiu-se nova centrifugação. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e os esplenócitos obtidos foram ressuspensos em 2 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico.

A concentração das células foi determinada por contagem na câmara de Neubauer utilizando-se o corante azul de tripan e plaqueadas na concentração de 10<sup>6</sup> células por poço. A seguir, foram adicionados os compostos na concentração de 50 µM.

Para observar a influência dos análogos na proliferação de linfócitos B, utilizou-se lipopolissacarídeo (LPS) obtido de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich) como estímulo na concentração de 1µg.mL<sup>-1</sup>, incubando-se por 1h e somente depois deste tempo reservado para a estimulação das células, seguiu-se com a adição dos

análogos. Já para estimular a diferenciação dos esplenócitos em linfócitos T, empregou-se como estímulo Concanavalina A ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , Sigma) (ConA) na concentração de  $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  previamente (1h) à adição dos análogos. Em seguida, as placas foram incubadas por 72h à  $37^\circ\text{C}$  e sob atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ .

Ao final da incubação, a proliferação celular foi determinada através do método do MTT, conforme descrito no item "4.4.2". O índice de proliferação (IP) foi calculado dividindo-se os valores determinados para as células estimuladas ou estimuladas e tratadas pelo valor referente ao controle não estimulado.

### **2.3.11 Avaliação do potencial anti-inflamatório dos análogos do resveratrol**

A investigação *in vitro* do potencial anti-inflamatório dos análogos consistiu no doseamento de nitrito como indicador da produção de NO em culturas de células RAW 264.7, J774.A1 e macrófagos peritoneais; doseamento de citocinas e quimiocina em culturas de células RAW264.7 e J774.A1; expressão de MHCII e coestimuladores em RAW 264.7; CTLA-4 em linfócitos; e índice de proliferação de esplenócitos.

#### **2.3.11.1 Determinação de Nitritos**

A quantidade de nitrito presente no sobrenadante das culturas pré-estimuladas por 1h com LPS ( $1\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) e  $\text{IFN-}\gamma$  ( $20\text{U/mL}^{-1}$ ) foi determinada em culturas de células RAW 264.7, J774.A1 ou macrófagos peritoneais e tratadas com os compostos nas concentrações de 10, 25 e  $50\mu\text{M}$  no ensaio com RAW 264.7 e  $50\mu\text{M}$  no ensaio com J774.A1 e macrófagos peritoneais. As placas foram incubadas por 48h quando foi mensurada a quantidade de nitritos produzida pelas culturas como um indicador da produção de NO por meio da Reação de Griess (GUEVARA *et al.*, 1998).

Para tanto, foram adicionadas  $50\mu\text{L}$  do sobrenadante obtidos das culturas tratadas a  $25\mu\text{L}$  de uma solução de sulfanilamida (0,5g de sulfanilamida em uma mistura de 5mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e 30mL da água, sendo a solução resultante diluída com água destilada, para 50,0 mL, em balão volumétrico), aguardando-se 2 minutos. Em seguida, foi adicionado  $25\mu\text{L}$  de uma solução de NED (0,05 g do cloridrato de *N*-(1-naftil)etilenodiamina (NEED), em água e diluída para 50,0 mL em balão volumétrico). Em seguida, foi efetuada a incubação à temperatura

ambiente por 10 minutos e posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) nas amostras foi obtida por meio de curva padrão de diluição seriada de uma solução de  $\text{NaNO}_2$  na concentração de 200  $\mu\text{M}$  (GUEVARA *et al.*, 1998).

O ensaio foi realizado três vezes, em triplicata, e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$ , comparando-se com os controles estimulado e não estimulado.

#### 2.3.11.2 Dosagem de citocinas

Utilizando-se o sobrenadante de culturas de RAW 264.7 e J774.A1 expostas aos compostos testados (50 $\mu\text{M}$ ) por 48h e 24h, respectivamente, foi procedida a dosagem de citocinas IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e quimiocina CCL-2 (MCP-1) (RAW264.7) e IL-1 $\beta$  (J774.A1), pelo método imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, usando kits comerciais (Becton & Dickinson Company ou R&D Systems), conforme protocolo do fabricante.

As concentrações das citocinas foram determinadas em comparação às curva-padrão obtidas. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 450 nm.

O ensaio foi realizado em triplicata, no mínimo duas vezes e os resultados expressos em ng/mL ou pg/mL.

#### 2.3.11.3 Influência dos análogos do resveratrol sobre a expressão de MHCII e moléculas coestimuladoras em RAW 264.7 e CTLA-4 em esplenócitos

A avaliação da influência do resveratrol e seus análogos na expressão de MHCII e das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 por células RAW 264.7 foi feita por citometria de fluxo de acordo com adaptações à técnica de Sharma *et al.* (2007). Para tanto, as células foram plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço e mantidos em placas de 24 poços quando então foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e IFN- $\gamma$  (20U/mL) e expostas ao tratamento com as substâncias testadas na concentração de 50  $\mu\text{M}$  por 24h. Ao fim do período de incubação, as placas contendo as células tiveram o sobrenadante recolhido e adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de tampão de

FACS (PBS com 1% de SFB e 0,09% de azida ( $\text{NaNO}_3$ )) gelado em cada poço homogeneizando-se com a pipeta 10 vezes de modo que os macrófagos se desprendessem do fundo da placa, sendo transferidos para placas de 96 poços fundo em "U".

A avaliação de CTLA-4 em esplenócitos foi iniciada com a retirada do baço e plaqueamento dos esplenócitos de modo idêntico ao descrito anteriormente (item 4.4.7).

As etapas seguintes para RAW 264.7 e esplenócitos foram idênticas e consistiram na centrifugação das placas a 250g por 10 minutos e o sobrenadante removido por inversão rápida da placa. Os macrófagos foram ressuspensos no volume residual e foram adicionados, a cada poço, 20 $\mu\text{L}$  de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpo anti-CD80 (Clone 16-10A1), anti-CD86 (clone GL1), anti-MHC (Clone AF6-120) (Becton & Dickinson) na concentração de 0,5 $\mu\text{g}$  por poço. Estes anticorpos apresentavam as marcações ficoeritrina (PE). Já os esplenócitos foram ressuspensos no volume residual e foram adicionados a cada poço 20 $\mu\text{L}$  de solução de tampão de FACS acrescida de anticorpo anti-CD3 (Clone 17A2) com a marcação peridina clorofila (PercP), anti-CD19 (clone HIB19) com a marcação alofocianina (APC), anti-CTLA-4 (Clone UC10-4B9) com a marcação PE. Estes anticorpos (Becton & Dickinson) foram utilizados na concentração de 0,5 $\mu\text{g}$ /poço.

Seguiu-se então uma incubação por 30 minutos a 4°C e acrescentou-se 200  $\mu\text{l}$ /poço de tampão de FACS seguido de centrifugação (250g, 10 minutos), sendo esse procedimento realizado duas vezes. As células foram então ressuspensas em 250  $\mu\text{l}$  de tampão de FACS e transferidas para tubos específicos para FACS (CORNING). As amostras foram coletadas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson), onde 30.000 eventos foram adquiridos.

Os resultados foram analisados pelo software Flowjo. A zona de macrófagos ou esplenócitos foi demarcada de acordo com o tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) característicos de cada célula e a média de intensidade de fluorescência (MIF) destas células foi determinada.

### 2.3.12 Análise estatística dos ensaios *in vitro*

Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 5.00, utilizando-se o teste não-paramétrico ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet ou Tukey. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,01$ .

### 2.3.13 Ensaios *in vivo*

Neste tópico serão apresentados os ensaios em modelos animais de edema de orelha e artrite induzida por Zymosan.

#### 2.3.13.1 Atividade anti-inflamatória dos análogos do resveratrol em modelo de edema de orelha

No teste de edema de orelha verificou-se a atividade anti-inflamatória dos análogos do resveratrol, por meio de aplicação tópica dos mesmos, em situações de inflamação aguda desencadeada pelo óleo de cróton (PINTO *et al.*; 2015). Este agente flogístico estimula a produção de mediadores pró-inflamatórios que promovem a vasodilatação, infiltração de leucócitos e extravasamento de plasma, conduzindo assim à instalação dos sinais clássicos da inflamação (DE BERNARDIS *et al.*, 1994).

O teste foi conduzido em um único dia, com uma aplicação única de 20 $\mu$ L de óleo de cróton (2,5% em acetona) (v/v) na orelha direita do animal e um minuto após, do composto a ser testado, sem necessidade de sedação ou anestesia. Os grupos foram formados por animais escolhidos de modo randomizado e cada grupo foi submetido às seguintes intervenções:

- 1) Controle negativo (n=6) – os animais receberam uma aplicação tópica (20 $\mu$ L) de óleo de cróton a 2,5% em acetona na orelha direita e foram tratados com acetona (veículo utilizado para a solubilização dos compostos) (20 $\mu$ L).

- 2) Controle positivo (n=6) – os animais receberam uma aplicação tópica (20 $\mu$ L) de óleo de cróton a 2,5% em acetona na orelha direita e foram tratados com 0,1mg de dexametasona em 20  $\mu$ L de acetona.

3) Resveratrol (n=6) - os animais receberam uma aplicação tópica (20µL) de óleo de cróton a 2,5% em acetona na orelha direita e tratados com 0,1mg de resveratrol em 20µL de acetona.

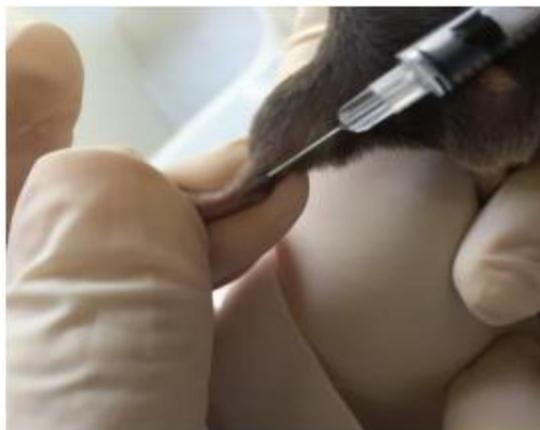
4) Análogos selecionados (AR07, AR13, AR23, AR25 e AR33) (n= 6 para cada análogo) - os animais receberam uma aplicação tópica (20µL) de óleo de cróton a 2,5% em acetona na orelha direita e tratados com 0,1mg de análogo 1 em 20 µL de acetona.

Como este ensaio já foi realizado previamente por Pinto *et al.* (2015) que estabeleceu a dose de 0,1mg de dexametasona por orelha, manteve-se esta dose que também foi utilizada para todos os compostos em questão, tendo em vista a possibilidade de comparar diretamente a ação dos compostos em estudo com a dexametasona.

Após o processo de indução da inflamação e tratamento com os compostos, aguardou-se 4 horas, quando então foi realizada a eutanásia dos animais. Em seguida, foram retiradas as duas orelhas de onde se cortou um fragmento central de tamanho padronizado (6 mm, biópsia com punch) que foi pesado, permitindo a comparação entre a massa do fragmento da orelha direita (inflamação induzida) e do fragmento da orelha esquerda (sem inflamação). A diferença entre a massa da orelha direita e esquerda foi tratada estatisticamente. Este fragmento foi dividido ao meio e uma metade foi processada para análises morfológicas e a outra, utilizada para determinação da produção de citocinas, CCL2 e atividade da enzima mieloperoxidase no tecido (conforme será descrito nos itens 4.5.4 e 4.5.5).

#### 2.3.13.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do resveratrol e análogos em modelo de artrite induzida por Zymosan

A artrite experimental foi induzida segundo a técnica utilizada por Dimitrova e colaboradores (2010), onde, um processo inflamatório articular desenvolve-se pela administração de 180µg de zymosan (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) dissolvido em solução salina estéril, na região da articulação talocrural e subtalar (direita e esquerda) dos membros posteriores (figura 7) de camundongos.



**Figura 7: Administração de Zymosan na região da articulação talocrural e subtalar.**

O Zymosan (Zy) é um composto capaz de ativar o complemento pela via alternativa e de induzir a secreção enzimática dos macrófagos, quando injetados nas articulações de camundongos. No período de 7 dias após a injeção intra-articular de Zy, é possível observar um quadro de artrite inflamatória crônica com infiltração de células mononucleares, hipertrofia sinovial e formação de pannus (KEYSTONE *et al.*, 1977).

Sendo assim, para este ensaio foram formados seis grupos com seis animais cada, escolhidos de modo randomizado e submetidos às seguintes intervenções de acordo com o grupo em que estavam alocados:

1) Controle negativo (n=6) – os animais receberam uma injeção contendo 20 $\mu$ L de salina 0,9% estéril nas patas traseiras. Este grupo recebeu como tratamento 1 mL de solução salina 0,9% + etanol 0,1% estéril por via IP durante 5 dias.

2) Controle positivo (n=6) – os animais receberam uma injeção contendo zymosan diluído em salina 0,9% estéril + etanol 0,1% (180 $\mu$ g de Zymosan em 20  $\mu$ L de veículo, igual para todos os grupos) nas patas traseiras. Este grupo recebeu como tratamento 1 mL de solução salina 0,9% estéril por via IP durante 5 dias.

3) Resveratrol (n=6) - os animais receberam uma injeção contendo zymosan diluído em salina 0,9% + etanol 0,1% estéril nas patas traseiras. Este grupo teve por tratamento a administração de 1 mL de uma solução de resveratrol em salina 0,9% estéril por via IP, na concentração de 50 mg/Kg/dia durante 5 dias.

4) Análogos selecionados 1 (n=6) - os animais receberam uma injeção contendo zymosan diluído em salina 0,9% + etanol 0,1% estéril nas patas traseiras.

Este grupo teve por tratamento a administração de 1 mL de uma solução do análogo em salina 0,9% + etanol 0,1% estéril por via IP, na concentração de 50 mg/Kg/dia durante 5 dias.

5) Dexametasona (n=6) - os animais receberam uma injeção contendo zymosan diluído em salina 0,9% + etanol 0,1% estéril nas patas traseiras. Este grupo recebeu como tratamento 1 mL de uma solução de dexametasona (4mg/Kg/dia) em salina 0,9% estéril + etanol 0,1% por via IP, na concentração de 50 mg/Kg/dia durante 5 dias (FLECKNELL, 2009; MORAIS *et al.*, 2010).

De acordo com o modelo descrito por Anjos *et al.* (2015), após a indução da inflamação pela injeção do Zy, aguardou-se por 5h para iniciar-se os tratamentos propostos, sendo este tempo padronizado como suficiente para a observação do início do infiltrado inflamatório. Foi realizado o tratamento por 5 dias e 24h após a última administração, os animais foram eutanasiados para remoção das patas traseiras contendo as articulações de interesse, as quais uma foi encaminhada para análise morfológica e a outra, para doseamento de citocinas e quimiocina nos tecidos (conforme descrito nos itens 4.5.4 e 4.5.5). Foram removidos também os baços de todos os animais, sendo os mesmos pesados e feita relação com a massa do animal para avaliar atrofia ou hipertrofia esplênica.

### **2.3.14 Análises morfológicas**

Os testes descritos acima - artrite induzida por Zy e edema de orelha -, originaram materiais que foram submetidos à análises histológicas. Deste modo, imediatamente após as articulações de ambos os membros posteriores, bem como a orelha direita serem removidas, lavadas em água destilada estéril para retirada do excesso de sangue e dissecadas.

Para as análises morfológica por histologia, as peças foram fixadas em paraformaldeído tamponado 4% (pH 7,4), durante 24 horas, descalcificado em solução de ácido nítrico 5% por 48 horas e em seguida lavados em água corrente por 24h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas, diafanizados e incluídas em parafina (Histosec-Merck). Foram obtidos cortes longitudinais com 3 µm de espessura, os quais foram desparafinizados e hidratados. Os cortes em lâminas foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) para análises morfológicas.

As análises morfológicas foram realizadas utilizando microscópio Olympus (BX53F) equipado com as objetivas U-PlanFL N 4/0.13, 10/0.30, 40/0.75 e 100/0.85. As imagens foram capturadas por uma câmera Olympus DP73 e através de software Cell Sens Imaging (5.1 version, Olympus, EUA).

Nas lâminas confeccionadas a partir dos membros posteriores (artrite induzida por Zy), de acordo com Anjos *et al.* (2015), procedeu-se uma análise para quantificação da área do infiltrado inflamatório principal utilizando o software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc.), onde a densidade celular do infiltrado inflamatório foi obtida utilizando 5 campos focalizados (objetiva de 100X). Para estabelecer a densidade absoluta de células no infiltrado inflamatório foi calculada usando-se a fórmula:

$$\text{Densidade absoluta} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células no campo} \times \text{área total do infiltrado}}{\text{Área do campo avaliado}}$$

### **2.3.15 Dosagem de mediadores inflamatórios nos tecidos – citocinas, quimiocina e atividade da mieloperoxidase**

Para a obtenção do homogenato a partir de fragmentos das orelhas ou dos membros posteriores dos animais foram utilizados para cada 100 mg de tecido 2 mL de PBS contendo inibidores de proteases (0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1mM cloreto de benzetônio, 10mM de ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) e 2 µL de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20, procedendo-se a maceração.

A seguir, as amostras foram centrifugadas a 440 x g, por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram armazenados a -20° C, até serem utilizados para dosagem de citocinas e quimiocinas através de ELISA. O sobrenadante do homogenato das orelhas foi utilizado para as dosagens de IL-1β, IL-6, CCL2 e mieloperoxidase. Já o sobrenadante oriundo dos membros posteriores foi utilizado para as dosagens de IL-1β, IL-6, TNF-α e CCL2. A dosagem de citocinas e quimiocinas foi realizado por meio de kits (BD) e todos os procedimentos seguiram as instruções do fabricante.

A determinação da atividade enzimática da MPO foi feita de acordo com a técnica adaptada descrita por Pulli *et al.* (2013). Deste modo, foram utilizados os precipitados resultantes da centrifugação anterior. Para isso, eles foram

ressuspendidos em solução salina 0.2% gelada e homogeneizados. Após 15 segundos, foi adicionada uma outra solução salina (NaCl 1.6% e glicose 5%) e eles foram novamente homogeneizados e, desta vez, centrifugados a 440 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 75 uL de solução de brometo de hexadecil-trimetil-amônio (HTAB) 0,5%. Em seguida, a solução preparada anteriormente foi submetida ao congelamento com nitrogênio e descongelamento em temperatura ambiente por 3 vezes consecutivas e centrifugadas a 700 x g durante 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram plaqueados em placas de 96 poços de fundo chato e, a eles, foi adicionada uma solução tampão citrato (citrato 0.1M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.04%, OPD 0.04%) na mesma proporção. Após 15 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro acoplado a leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices) a 490 nm e os resultados expressos em unidade de densidade ótica (DO) e comparados com o controle inflamado.

#### **2.3.16 Análise estatística dos ensaios *in vivo***

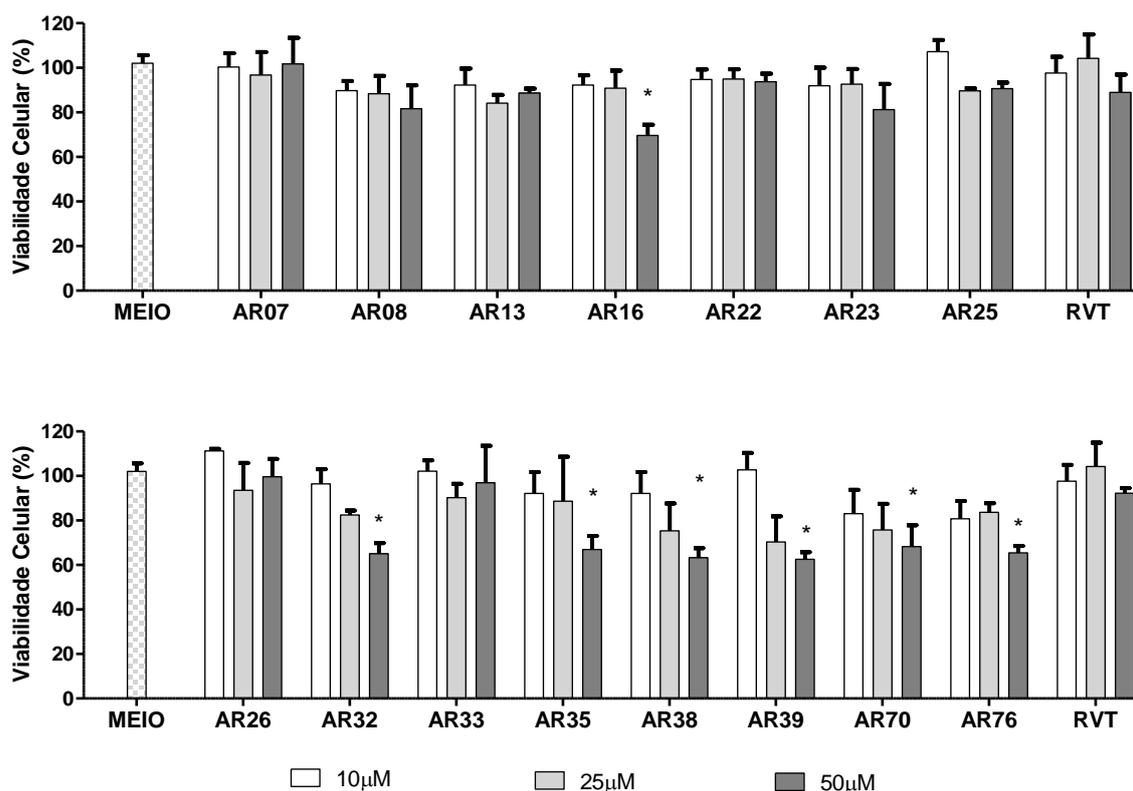
Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 5.00, utilizando-se o teste não-paramétrico ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,01$ .

## 2.4 RESULTADOS

### **2.4.1 Seleção dos análogos do resveratrol segundo a influência na viabilidade de células RAW 264.7**

Os análogos do resveratrol foram avaliados quanto a sua influência na viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7, como uma medida indireta de sua citotoxicidade. Nestes ensaios foram utilizadas três concentrações distintas de cada análogo (50, 25 e 10  $\mu\text{M}$ ), visando selecionar aqueles compostos com menor influência na viabilidade celular e, portanto, menor potencial citotóxico.

Conforme demonstrado na figura 8, os compostos AR16, AR32, AR35, AR38, AR39, AR70 e AR76 reduziram a viabilidade significativamente em comparação ao meio na concentração de 50 $\mu\text{M}$ , contrastando-se com o resveratrol que não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas. Ademais, esses compostos induziram uma redução da viabilidade para valores inferiores a 70%, valor este estabelecido como limite mínimo aceitável no presente estudo seguindo a ISO10993:2009. O etanol, utilizado como solvente para os análogos na concentração máxima de 0,1%, também foi testado nesta concentração e não alterou a viabilidade das células (dados não mostrados).



**Figura 8: Avaliação da influência dos análogos do resveratrol sobre a viabilidade de células RAW 264.7 nas concentrações de 10 μM, 25 μM e 50 μM.** Células RAW 264.7 foram plaqueadas na concentração de  $2 \cdot 10^5$  células por poço e expostas às concentrações de 10, 25 e 50 μM dos análogos ou do resveratrol. Após um período de 48h de incubação, foi feita a avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT. O resultado foi expresso em percentual de sobrevivência celular calculado comparativamente ao controle (meio). O etanol 0,1% (não demonstrado) não influenciou a viabilidade. \*diferença na comparação com o meio (ANOVA/Dunnet,  $p < 0,01$ ). RVT: resveratrol.

Assim, uma vez que os compostos AR16, AR32, AR35, AR38, AR39, AR70 e AR76 apresentaram importante influência na viabilidade de células RAW264.7, estes compostos foram excluídos dos ensaios posteriores. Dentre os compostos eleitos para as análises seguintes encontram-se sete iminas (AR07, AR08, AR13, AR22, AR23, AR25, AR26) e uma hidrazona (AR33).

#### 2.4.2 LC<sub>50</sub> dos análogos do resveratrol sobre células RAW 264.7

Uma vez determinado quais os análogos não influenciam na viabilidade de células RAW 264.7 e que são capazes de reduzir a viabilidade de células tumorais, foi

determinada a LC<sub>50</sub> dos compostos em células da linhagem RAW 264.7, conforme exposto na tabela 4.

**Tabela 4: Perfil de toxicidade do resveratrol e análogos em células RAW 264.7, expressos em LC<sub>50</sub> (µM).**

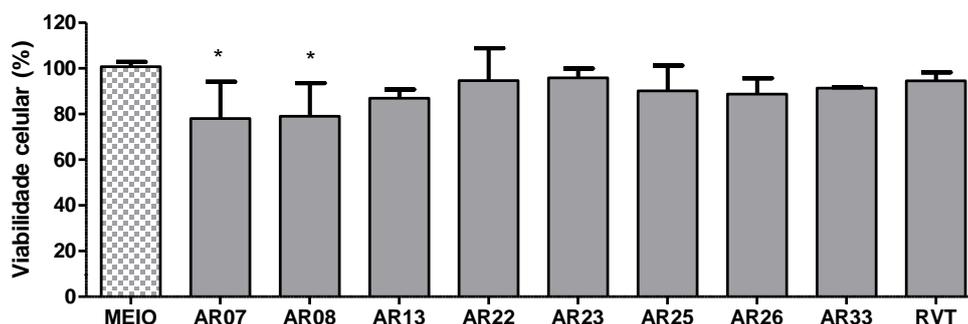
COMPOSTO	LC <sub>50</sub> (µM)
AR07	87,42±0,7 <sup>b</sup>
AR08	118,2±1,8 <sup>c</sup>
AR13	83,47±1,5 <sup>b</sup>
AR22	229,4±1,0 <sup>d</sup>
AR23	54,4±0,9 <sup>a</sup>
AR25	242,1±2,0 <sup>e</sup>
AR26	398,5±1,8 <sup>e</sup>
AR33	53,9±0,6 <sup>a</sup>
Resveratrol	89,62±0,6 <sup>b</sup>

Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

Diante dos valores de LC<sub>50</sub> obtidos para os análogos, observou-se que os compostos AR07, AR13, AR23 e AR33 apresentaram valores de LC<sub>50</sub> inferiores ao do resveratrol, porém, estatisticamente, apenas os análogos AR23 e AR33 demonstraram-se diferentes do mesmo. Os demais análogos necessitaram de concentrações iguais ou superiores ao do composto precursor para causar toxicidade a 50% da população celular.

#### **2.4.3 Influência dos análogos do resveratrol na viabilidade de células da linhagem J774.A1 e macrófagos peritoneais**

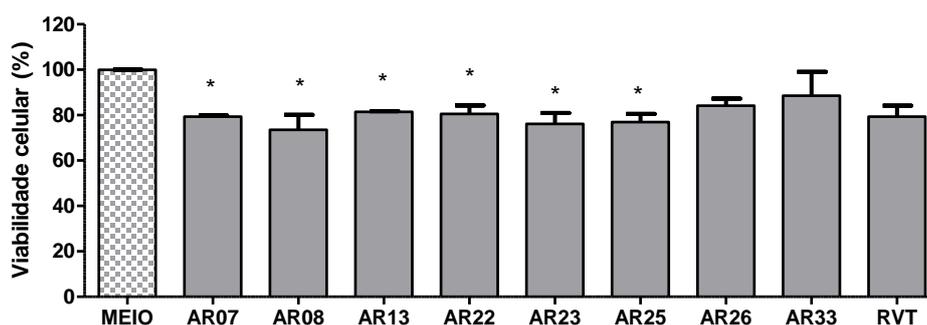
Com a finalidade de ampliar o painel celular testado para citotoxicidade dos análogos e, conseqüentemente, a segurança em usá-los, células da linhagem J774.A1 foram expostas a concentração de 50µM (a maior concentração estabelecida neste estudo), e procedida a avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT (Figura 9).



**Figura 9: Avaliação da influência dos análogos do resveratrol sobre a viabilidade de células J774.A1 na concentração de 50 µM.** Células J774.A1 foram plaqueadas na concentração de  $2 \cdot 10^5$  células por poço e expostas às concentrações de 50µM dos análogos ou do resveratrol. Após um período de 24h de incubação, foi feita a avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT. O resultado foi expresso em percentual de sobrevivência celular calculado comparativamente ao controle (meio). O etanol 0,1% (não demonstrado) não induziu diminuição da viabilidade. \*diferença em relação ao meio (ANOVA/Dunnet,  $p < 0,01$ ). RVT: resveratrol.

Frente às células J774.A1, apenas os análogos AR07 e AR08 apresentaram uma redução significativa da viabilidade reduzindo, respectivamente, para 78% e 79% sendo, por isso, estatisticamente diferentes do grupo controle não tratado (meio). No entanto, como mesmo sob ação destes compostos não houve redução inferior a 70%, conforme preconizado na ISO10993-5:2009, os análogos não foram considerados tóxicos para a linhagem J774.A1. É importante ressaltar que, como esta linhagem foi utilizada para avaliar a produção da citocina IL-1 $\beta$  que atinge seu pico de produção em torno de 24 horas, este tempo foi selecionado para a análise da viabilidade celular.

Visto que células de culturas primárias apresentam diversas diferenças em relação a células de linhagens imortalizadas, sendo em geral mais sensíveis (KAUR e DUFOUR, 2012), o mesmo teste de viabilidade foi então realizado em cultura primária de macrófagos peritoneais após 48 horas de exposição aos análogos (50µM) (Figura 10).



**Figura 10: Avaliação da influência de análogos do resveratrol sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais na concentração de 50 µM.**

A produção de macrófagos foi estimulada em camundongos C57/Bl-6 pela injeção peritoneal de 3mL de tioglicolato de sódio 2% (m/v) 72h antes do ensaio. Após eutanásia, os macrófagos foram retirados, lavados e plaqueadas na concentração de  $2 \cdot 10^5$  células por poço. As células foram expostas à concentração de 50µM dos análogos ou do resveratrol. Após um período de 48h de incubação, foi feita a avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT. O resultado foi expresso em percentual de sobrevivência celular calculado comparativamente ao controle (meio). O etanol 0,1% (não demonstrado) não influenciou na viabilidade. \*diferença na comparação com o meio (ANOVA/Dunnet,  $p < 0,01$ ). RVT: resveratrol.

Com base nestes resultados foi possível observar que os análogos AR07, AR08, AR13, AR22, AR23 e AR25 reduziram a viabilidade celular quando comparada a viabilidade do meio (controle do ensaio), porém sem atingir valores inferiores a 70%. A menor viabilidade observada ocorreu após a exposição ao AR08, sendo igual a 73,5%. Desta forma, semelhante ao descrito previamente, estes compostos não foram considerados tóxicos segundo a ISO 10993-5:2009. Sendo assim, na concentração de 50µM, os análogos não foram tóxicos para células RAW 264.7, J774.A1 e macrófagos peritoneais.

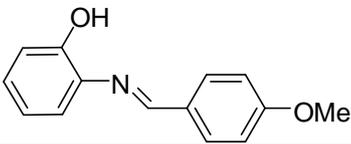
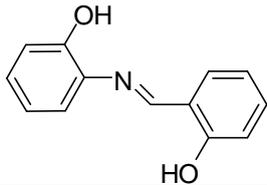
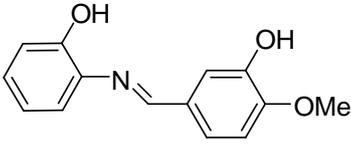
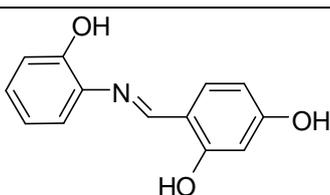
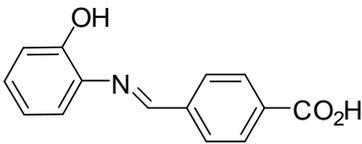
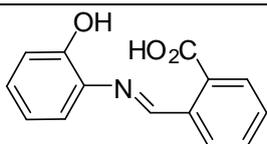
Em concordância com o observado previamente, o solvente etanol (0,1%) não demonstrou redução da viabilidade celular quando comparado ao meio.

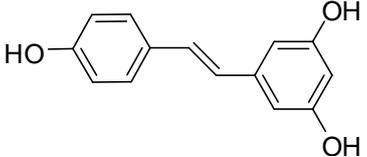
#### 2.4.4 Potencial antioxidante dos análogos do resveratrol

Diversos estudos têm relacionado o potencial antioxidante do resveratrol com suas atividades anti-inflamatórias, podendo este ser um ponto chave de seu mecanismo no contexto do sistema imune. Além disso, a atividade antioxidante também tem uma intrínseca relação com o potencial anti-tumoral de uma substância.

(BOVE, LINCOLN e TSAN, 2002). Devido a isso, a atividade antioxidante dos análogos do resveratrol também foi avaliada pelo método de captura do íon DPPH. Os resultados, expressos em IC<sub>50</sub> (μM), estão dispostos na tabela abaixo, bem como o coeficiente de relação (r) da equação da reta utilizada para o cálculo deste valor (Tabela 5).

**Tabela 5:** Atividade antioxidante expressa em IC<sub>50</sub> (μM) do resveratrol e análogos, pelo método DPPH e coeficiente de relação (r) obtido.

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	IC <sub>50</sub> (μM)	R
AR07		45.8±3.3 <sup>b</sup>	0,9970
AR08		35.9±3.2 <sup>cd</sup>	0,9930
AR13		34.5±1.6 <sup>cd</sup>	0,9932
AR22		49.1±5.3 <sup>b</sup>	0,9932
AR23	Protegido	43,6±1.6 <sup>bc</sup>	0,9812
AR25		36.6±2.9 <sup>c</sup>	0,9824
AR26		34.1±1.9 <sup>d</sup>	0,9968
AR33	Protegido	27,4±1.2 <sup>d</sup>	0,9949

Resveratrol		$65.6 \pm 3.2^a$	0,9994
-------------	-----------------------------------------------------------------------------------	------------------	--------

Diferentes letras representam médias distintas (one-way ANOVA/Tukey,  $p < 0,01$ ).

Conforme demonstrado na tabela 5, todos os análogos avaliados apresentaram potencial antioxidante superior ao do resveratrol, com destaque para os análogos AR08, AR13, AR26 e AR33 que apresentaram os menores valores de  $IC_{50}$ .

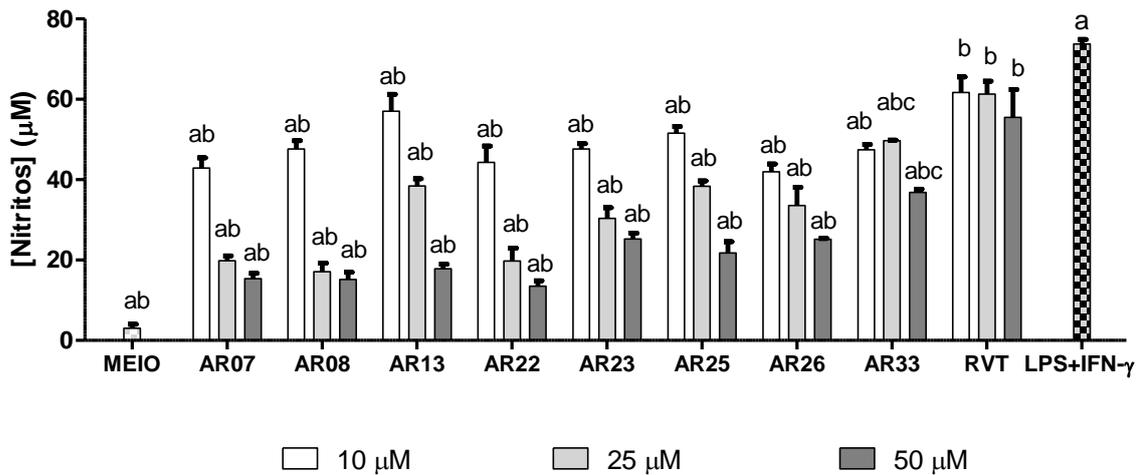
O valor de  $IC_{50}$  encontrado para o resveratrol baseado na captura do radical DPPH ( $65,06 \mu\text{M}$ ) foi próximo ao encontrado por Wang *et al.* (2014)  $70,22 \mu\text{M}$ , considerada as diferenças nas condições de trabalho.

#### 2.4.5 Determinação do potencial anti-inflamatório *in vitro* dos análogos do resveratrol

Os resultados a seguir fazem parte da determinação da atividade anti-inflamatória *in vitro* dos análogos do resveratrol.

##### 2.4.5.1 Influência dos análogos do resveratrol na produção de NO por células RAW 264.7

Para determinar se os compostos selecionados apresentavam alguma atividade sobre a produção de NO, um importante mediador inflamatório, células RAW 264.7 foram pré-estimuladas com LPS ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e IFN- $\gamma$  ( $20 \text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) por uma hora e em seguida tratadas com diferentes concentrações dos análogos (10, 25 e  $50 \mu\text{M}$ ). Após 48 horas, a concentração de NO foi determinada no sobrenadante das culturas (Figura 11).



**Figura 11: Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264.7 pré-estimuladas e tratadas com análogos do resveratrol em diferentes concentrações.** Células RAW 264.7 foram plaqueadas na concentração de  $2.10^5$  células por poço e estimuladas com LPS ( $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e IFN- $\gamma$  ( $20\text{U.mL}^{-1}$ ). Após 1 hora de estímulo, as células foram tratadas com resveratrol ou análogos nas concentrações de 50, 25 e  $10\mu\text{M}$ . Após 48h, foi realizado o doseamento de nitritos por meio da reação de Griess. O resultado foi expresso em  $\mu\text{M}$  e comparado com a produção de NO apresentada pelo controle estimulado e não tratado. A influência do solvente (etanol 0,1%) também foi avaliada e não induziu diminuição nos níveis de NO (não demonstrado) (“a” diferentes em relação ao resveratrol; “b” diferentes em relação ao controle não tratado (LPS+IFN- $\gamma$ ) (one-way ANOVA/Tukey,  $p < 0,01$ ).

De acordo com o gráfico da figura 11, todos os análogos avaliados foram capazes de reduzir a produção de NO de maneira significativa, inclusive na concentração mais baixa testada ( $10\mu\text{M}$ ). Nas presentes condições de estudo, o resveratrol também foi capaz de reduzir a produção de NO, embora de maneira menos eficiente que os análogos em questão.

Ao se comparar qualquer uma das três concentrações testadas dos análogos com a mesma concentração do resveratrol foi possível perceber o maior potencial dos análogos na diminuição dos níveis de NO, exceto no caso dos análogos AR07 e AR13 na concentração de  $10\mu\text{M}$ . Deste modo, os resultados revelaram que todos os análogos nas concentrações de 25 e  $50\mu\text{M}$  são mais efetivos que o resveratrol no teste em questão.

O mesmo ensaio foi realizado com células J774.A1 e com macrófagos peritoneais, utilizando-se a concentração de  $50\mu\text{M}$  dos análogos, fornecendo resultados muito semelhantes aos obtidos com RAW 264.7.

#### 2.4.5.2 Influência dos análogos do resveratrol na produção de citocinas

Uma das principais respostas do sistema imune inato a infecções e danos teciduais é a secreção de citocinas, as quais são extremamente importantes nas respostas inflamatórias agudas (HAFLEER, 2007). Assim, uma vez que os análogos do resveratrol foram capazes de reduzir significativamente a produção de NO, sua ação sobre importantes citocinas envolvidas nas respostas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), assim como sobre a quimiocina CCL2, também foi determinada (Tabela 6).

**Tabela 6: Influência do resveratrol e análogos (50 $\mu$ M) na produção de e quimiocina em células RAW 264.7 (CCL-2, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ ), J774.A1 (IL-1 $\beta$ ) e esplenócitos (IFN- $\gamma$ ).**

	CCL-2 (ng.mL <sup>-1</sup> )	IL-1 $\beta$ (pg.mL <sup>-1</sup> )	IL-6 (ng.mL <sup>-1</sup> )	IL-10 (pg.mL <sup>-1</sup> )	IL-12 (pg.mL <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ (ng.mL <sup>-1</sup> )	IFN- $\gamma$ (ng.mL <sup>-1</sup> )
<b>Meio</b>	2,90 $\pm$ 0,01*	ND $\pm$ 0*	0,4 $\pm$ 0,1*	167,0 $\pm$ 15,6*	38,7 $\pm$ 49,5*	15,4 $\pm$ 3,6*	2,4 $\pm$ 0,8*
<b>Estímulo</b>	12,73 $\pm$ 0,10	382,3 $\pm$ 50,0	2,9 $\pm$ 0,3	401,0 $\pm$ 1,6	4839,2 $\pm$ 2,2	58,6 $\pm$ 7,4	6,8 $\pm$ 0,1
<b>AR07</b>	7,90 $\pm$ 0,04*	88,2 $\pm$ 11,4*	2,1 $\pm$ 0,2*	189,3 $\pm$ 5,2*	4,7 $\pm$ 0,3*	44,2 $\pm$ 4,7*	6,1 $\pm$ 1,0
<b>AR08</b>	7,20 $\pm$ 0,10*	62,3 $\pm$ 27,1*	2,2 $\pm$ 0,2*	130,9 $\pm$ 19,7*	5,5 $\pm$ 2,1*	58,4 $\pm$ 6,7	5,2 $\pm$ 0,9
<b>AR13</b>	9,70 $\pm$ 0,05*	120,3 $\pm$ 28,1*	2,2 $\pm$ 0,1*	197,4 $\pm$ 6,1*	7,7 $\pm$ 0,6*	60,5 $\pm$ 0,8	3,5 $\pm$ 0,8*
<b>AR22</b>	5,50 $\pm$ 0,08*	188,3 $\pm$ 11,5*	2,2 $\pm$ 0,1*	93,9 $\pm$ 7,4*	9,3 $\pm$ 1,5*	44,8 $\pm$ 4,7*	4,3 $\pm$ 0,04*
<b>AR23</b>	2,50 $\pm$ 0,04*	132,0 $\pm$ 19,9*	1,50 $\pm$ 0,3*	100,0 $\pm$ 1,7*	5,4 $\pm$ 2,0*	33,4 $\pm$ 0,8*	3,5 $\pm$ 0,4*
<b>AR25</b>	3,70 $\pm$ 0,04*	53,4 $\pm$ 16,7*	2,2 $\pm$ 0,2*	181,6 $\pm$ 6,1*	12,7 $\pm$ 1,3*	30,6 $\pm$ 3,9*	6,7 $\pm$ 0,3
<b>AR26</b>	6,10 $\pm$ 0,05*	76,7 $\pm$ 36,3*	2,3 $\pm$ 0,2*	317,0 $\pm$ 5,3	34,0 $\pm$ 7,5*	57,4 $\pm$ 3,1	4,7 $\pm$ 0,9
<b>AR33</b>	2,20 $\pm$ 0,03*	1,3 $\pm$ 0,2*	2,5 $\pm$ 0,2*	138,5 $\pm$ 0,5*	9,2 $\pm$ 1,1*	36,8 $\pm$ 2,1*	1,7 $\pm$ 0,5*
<b>RVT</b>	6,60 $\pm$ 0,01*	159,7 $\pm$ 33,5*	1,6 $\pm$ 0,1*	165,6 $\pm$ 5,3*	1036,0 $\pm$ 209,6	31,0 $\pm$ 0,8*	1,6 $\pm$ 0,4*

\* significativo em relação ao controle estimulado (one-way ANOVA/Dunnet, p<0,01). ND – não determinado. RVT – resveratrol.

Em concordância com a redução na produção de NO, os resultados demonstraram que todos os análogos foram capazes de promover uma significativa diminuição na produção de, pelo menos, três das citocinas avaliadas.

Mereceu destaque a atividade apresentada pelos compostos AR07, AR22, AR23, AR25 e AR33, uma vez que foram capazes de promover a redução de todos

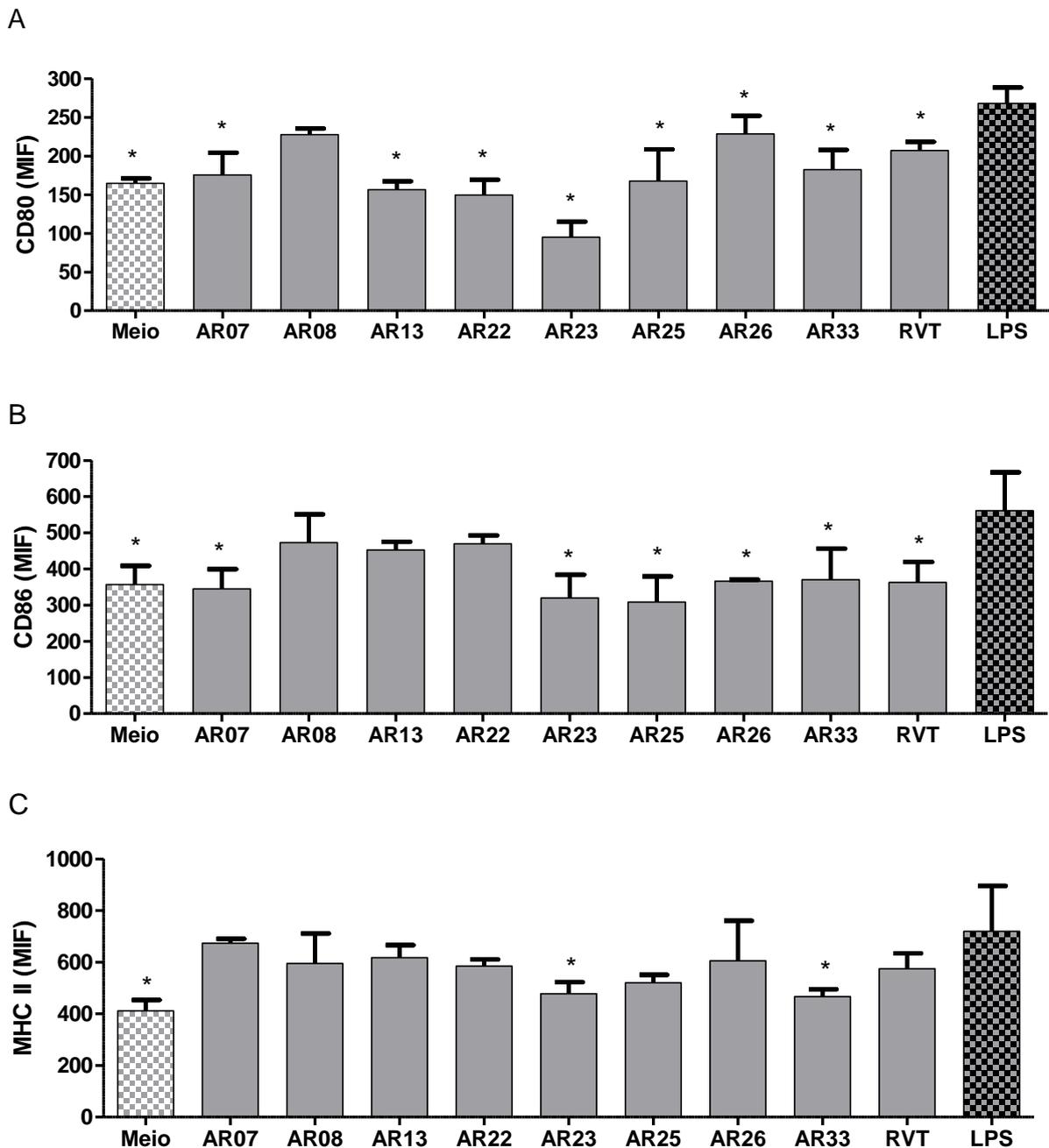
os mediadores de caráter inflamatório (CCL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) quando comparados ao controle estimulado. Com relação ao AR26, apesar ter sido o único análogo que não diminuiu os níveis de IL-10, este não foi capaz de reduzir importantes citocinas envolvidas no processo inflamatório, tais como IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Com relação a IL-10, observou-se *in vitro* uma diminuição em seus níveis por células expostas aos análogos, com exceção de AR26. Com base neste achado, pode-se inferir que a redução na produção das outras citocinas não foi uma consequência de um aumento na produção de IL-10.

#### 2.4.5.3 Influência dos análogos do resveratrol na expressão a molécula MHCII e dos coestimuladores CD80 e CD86

Uma vez que os análogos do resveratrol foram capazes de modular a produção de NO e de citocinas derivadas de macrófagos, avaliou-se também a ação destes compostos sobre a expressão das moléculas de MHC de classe II e dos coestimuladores CD80 e CD86, tendo em vista que a diminuição de tais moléculas tem implicação direta na capacidade de a imunidade inata ativar a imunidade adquirida (SO *et al.*, 2012).

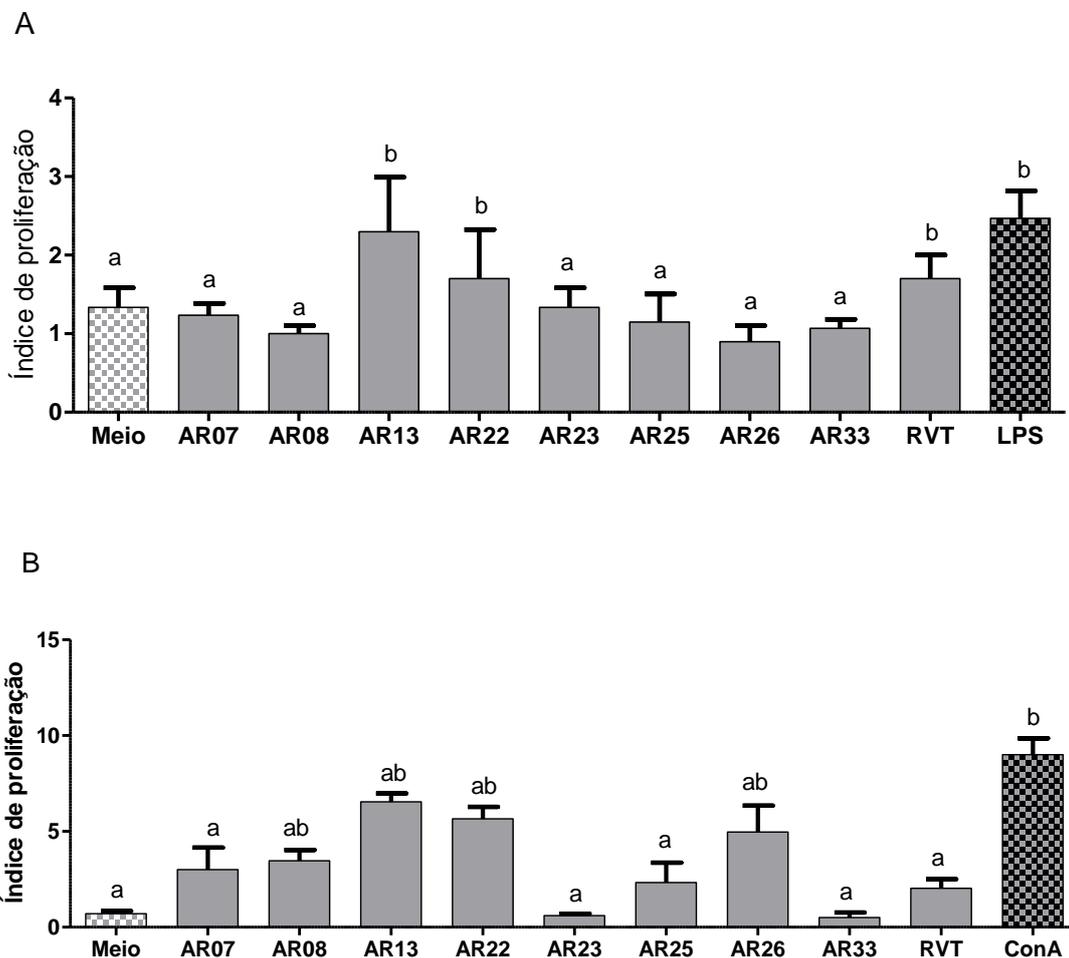
Conforme demonstrado no gráfico (figura 12), todos os análogos foram efetivos em reduzir a expressão da molécula CD80, com exceção do composto AR08. Já os análogos AR07, AR23, AR25, AR26 e AR33 também foram efetivos na redução da expressão do coestimulador CD86. De forma surpreendente, os compostos AR23 e AR33 também influenciaram negativamente a expressão da molécula apresentadora MHCII. Em relação ao resveratrol, este também foi efetivo em reduzir a expressão de CD80 e de CD86, conforme previamente descrito na literatura (SHARMA *et al.*, 2007), porém não mostrou atividade significativa sobre as moléculas de MHC II.



**Figura 12 : Influência dos análogos do resveratrol na expressão de (A) CD80, (B) CD86 e (C) MHCII por RAW 264.7 estimuladas com LPS.** Células RAW 264.7 foram estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  ( $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) por uma hora e então tratados com resveratrol ou análogos na concentração de  $50\mu\text{M}$ . Após 24 horas, a expressão dos marcadores foi determinada por citometria de fluxo. O etanol 0,1% (não demonstrado) não apresentou influência na expressão dos marcadores avaliados. \*significativo em relação ao controle estimulado (LPS) (ANOVA/Dunnet,  $p < 0,01$ ). RVT: resveratrol.

#### 2.4.5.4 Influência dos análogos do resveratrol na proliferação de LB e LT

Uma vez que os análogos do resveratrol foram capazes de reduzir a produção de NO, citocinas/quimiocina e de coestimuladores em células da imunidade inata e adquirida, o próximo passo foi determinar a ação destes compostos sobre a proliferação de linfócitos. Para isso, esplenócitos extraídos de camundongos C57BL/6 foram pré-estimulados com LPS (mitógeno de células B) ou com concanavalina A (mitógeno de células T) e tratados com os análogos. Após 48 horas, os índices de proliferação foram determinados e apresentados na figura abaixo (Figura 13).



**Figura 13: Influência dos análogos do resveratrol na proliferação de esplenócitos estimulados com (A) Lipopolissacarídeo e (B) Concanavalina A.** Esplenócitos de camundongos C57BL/6 ( $10^6$  células por poço) foram cultivados na presença dos estímulos (A) LPS ( $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ou (B) ConA ( $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 2 horas. Em seguida, as células foram tratadas com o resveratrol ou análogos na concentração de  $50\mu\text{M}$ . Após 48 horas de incubação o índice de proliferação celular foi avaliado pelo método de MTT. Como controles foram utilizados os controles estimulados e não tratados (LPS ou ConA), bem como o controle não estimulado e não tratado (meio). O índice de proliferação foi calculado levando-se em conta a metabolização do MTT

de células estimuladas e células não estimuladas. A letra “a” significa médias diferentes do controle estimulado ( $p < 0,01$ ); e “b”, diferentes do meio (one-way ANOVA/Tukey,  $p < 0,01$ ). RVT: resveratrol.

Os resultados demonstraram que, em resposta ao estímulo com LPS (Figura 13A), somente os análogos AR13 e AR22, bem como o resveratrol não foram efetivos em reduzir a proliferação celular, quando comparados ao controle estimulado. Por outro lado, é possível perceber que os compostos AR07, AR08, AR22, AR25, AR26 e AR33 apresentaram grande eficácia, uma vez que o índice de proliferação encontrado após o tratamento com estes compostos não foi diferente daquele encontrado para células não estimuladas. Índices de proliferação menores que o apresentado pelo meio (controle) não são desejáveis, tendo em vista que indicam morte celular. Assim, os resultados demonstraram que os análogos estudados são capazes de inibir a proliferação de células B, o que sugere uma ação moduladora dos mesmos sobre a resposta imune humoral.

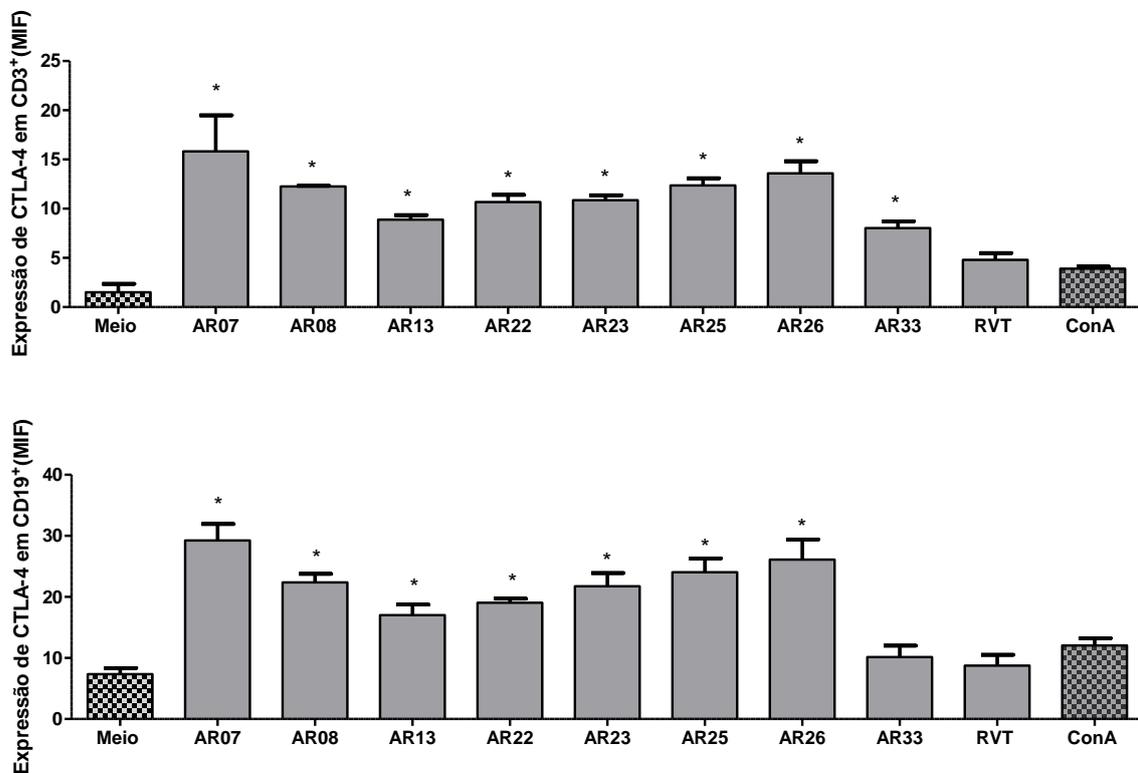
Analisando a ação dos análogos sobre a proliferação de células T (estímulo com conA) (Figura 13B), foi possível observar um resultado semelhante àquele encontrado para os linfócitos B. Todos os compostos induziram uma redução significativa na proliferação celular, quando comparado ao controle estimulado. Além disso, os compostos AR23, AR25, AR33 e o resveratrol destacaram-se como sendo os mais efetivos em inibir a proliferação que alcançou valores estatisticamente iguais ao apresentado pelo meio (controle). Assim, visto que a ConA age como mitógeno para linfócitos T, estes achados permitem sugerir que, além da ação sobre a resposta humoral, os análogos do resveratrol também são capazes de interferir na resposta imune celular.

#### 2.4.5.5 Influência dos análogos na expressão de CTLA-4 em populações de esplenócitos

A molécula CTLA-4 está presente na superfície de células T ativadas de forma homóloga ao CD28. Ambas as moléculas têm afinidade pelos mesmos ligantes B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86), mas com funções antagônicas. Enquanto CD28 é um co-estimulador importante, CTLA-4 tem função inibitória essencial na manutenção da

homeostase do sistema imunitário diminuindo a proliferação de LT antígeno-específicos (INTLEKOFER e THOMPSON, 2013). Esta molécula também está presente em LB, controlando a liberação de anticorpos de maneira multifacetada e não muito bem estabelecida (SAGE *et al.*, 2014).

Diante de sua conhecida importância no controle da imunidade celular e de sua influência também na resposta humoral, a expressão de CTLA-4 foi verificada em esplenócitos pré-estimulados com conA e expostos aos análogos (50 $\mu$ M). A expressão desta molécula moduladora em linfócitos CD3<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> expostos aos análogos (50 $\mu$ M) está representado na figura abaixo (Figura 14A e 14B).



**Figura 14: Influência dos análogos do resveratrol na expressão de CTLA-4 em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) e T (CD3<sup>+</sup>) em esplenócitos estimulados com ConA.** Esplenócitos foram estimulados com ConA (5 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) e tratados com resveratrol ou análogos na concentração de 50  $\mu$ M. Após 72 horas, a expressão dos marcadores foi determinada por citometria de fluxo. O etanol 0,1% (não demonstrado) não apresentou influência na expressão dos marcadores avaliados. \*diferença na comparação com o controle estimulado (ConA) (ANOVA/Dunnet, p<0,01). RVT: resveratrol.

As células foram diferenciadas pela expressão de CD19 e CD3. Células CD19<sup>+</sup> foram identificadas como LB e nestas, observou-se que apenas os análogos AR33 e o resveratrol não foram capazes de aumentar a expressão de CTLA-4, sendo ambos, o meio e o estímulo estatisticamente iguais. Considerando que esta molécula

atue, de um modo geral, como um modulador negativo na resposta humoral, espera-se que os análogos (com exceção de AR33) sejam capazes de reduzir a produção de anticorpos.

Um resultado bastante semelhante foi identificado em células CD3<sup>+</sup>, representando os LT, nas quais apenas o resveratrol não foi capaz de induzir aumento na expressão de CTLA-4. Este achado corresponde a uma diminuição na imunidade celular, fenômeno este que se apresenta acentuado em inflamações crônicas.

#### **2.4.6 Seleção dos análogos para ensaios *in vivo* de atividade anti-inflamatória**

Os resultados dos ensaios *in vitro* revelaram que os análogos não apresentaram influência na viabilidade de diferentes linhagens celulares, são potentes antioxidantes e potenciais redutores da produção de NO. No entanto, o diferencial de cada um na capacidade de modular as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , a quimiocina CCL-2, a expressão de MHCII e CD80, CD86 e CTLA-4, bem como a proliferação de LT e LB (Quadro 3), foi considerado para o estabelecimento daqueles com maior potencial anti-inflamatório.

**Quadro 2: Sumário dos critérios avaliados para atividade anti-inflamatória *in vitro* e capacidade dos análogos em exercer um efeito anti-inflamatório.**

	AR07	AR08	AR13	AR22	AR23	AR25	AR26	AR33	RVT
↓ [CCL2]	+	+	+	+	+	+	+	+	+
↓ [IL-1 $\beta$ ]	+	+	+	+	+	+	+	+	+
↓ [IL-6]	+	+	+	+	+	+	+	+	+
↑ [IL-10]	-	-	-	-	-	-	+	-	-
↓ [IL-12]	+	+	+	+	+	+	+	+	+
↓ [IFN- $\gamma$ ]	-	-	+	+	+	-	-	+	+
↓ [TNF- $\alpha$ ]	+	-	-	+	+	+	-	+	+
↓ CD80	+	-	+	+	+	+	+	+	+
↓ CD86	+	-	-	-	+	+	-	+	+
↑ CTLA-4 em CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
↑ CTLA-4 em CD3 <sup>+</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
↓ MHCII	-	-	-	-	+	-	-	+	-
↓ Proliferação LPS	+	+	-	-	+	+	+	+	-
↓ Proliferação ConA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>TOTAL</b>	<b>11/14</b>	<b>8/14</b>	<b>9/14</b>	<b>10/14</b>	<b>13/14</b>	<b>11/14</b>	<b>10/14</b>	<b>12/14</b>	<b>9/14</b>

+: influência compatível com padrão anti-inflamatório; -: influência incompatível com padrão anti-inflamatório ou ausência de atividade relevante.

Com esta análise, os análogos AR07, AR23, AR25 e AR33 foram selecionados como os mais promissores para serem empregados na etapa *in vivo* com ensaios anti-inflamatórios.

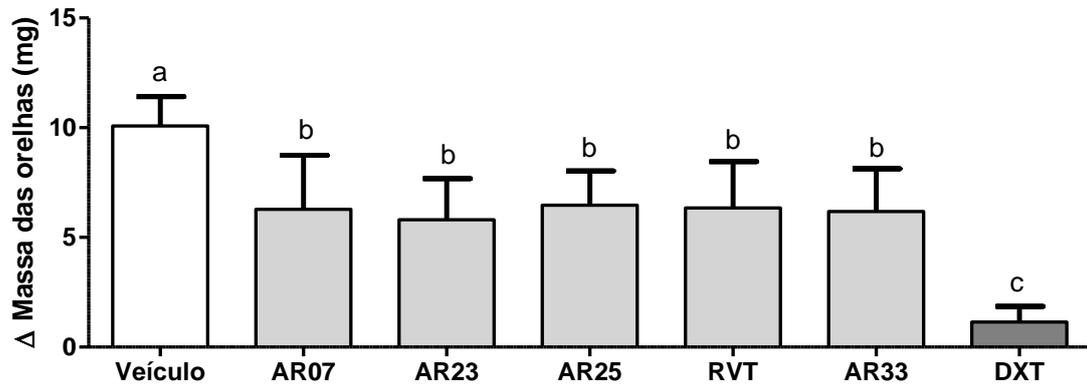
#### 2.4.7 Determinação da atividade anti-inflamatória *in vivo*

Os resultados a seguir fazem parte da determinação da atividade anti-inflamatória *in vivo* dos análogos do resveratrol, consistindo no uso dos mesmos em dois modelos de inflamação: edema de orelha e artrite induzida por Zymosan.

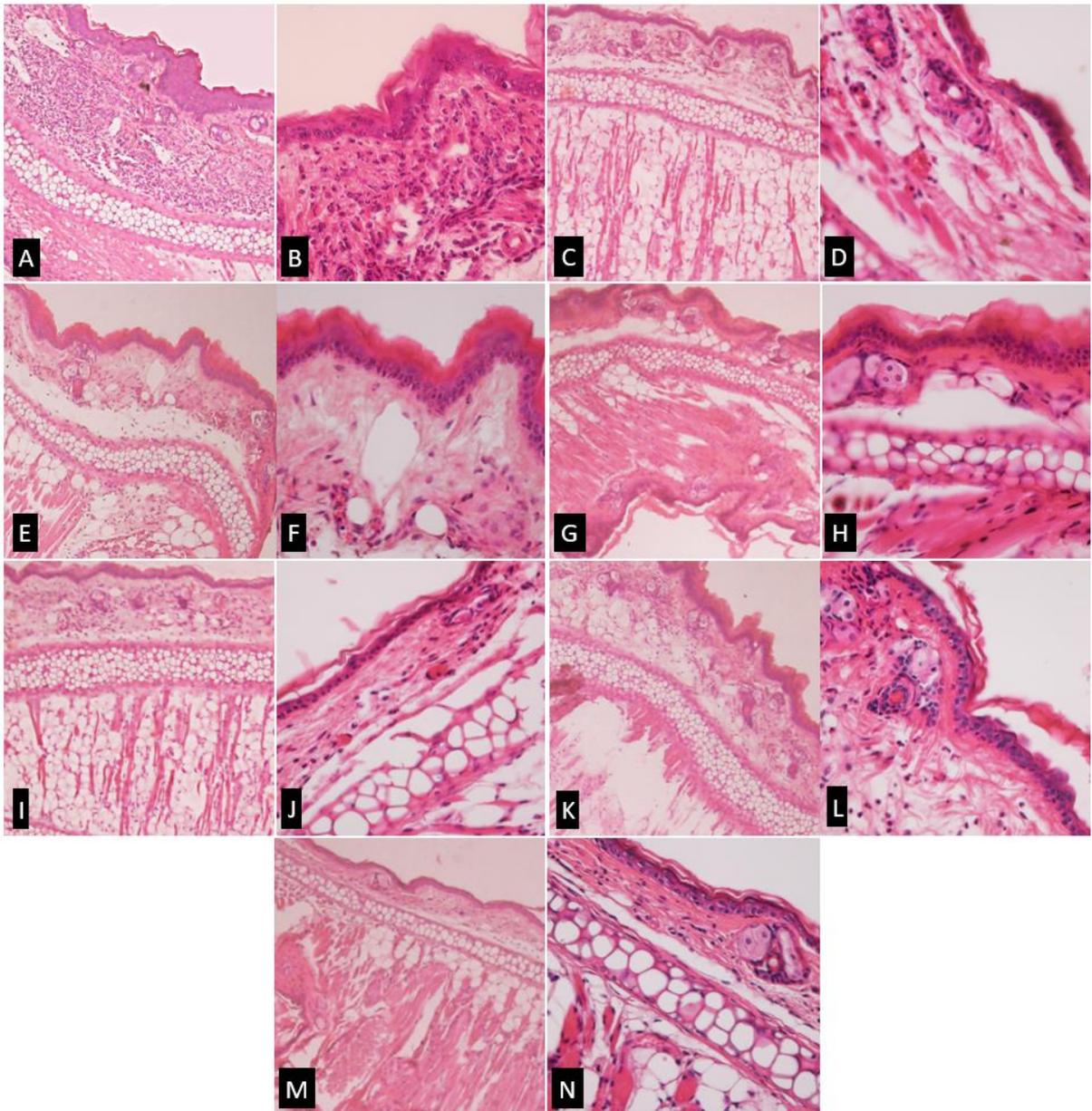
##### **2.4.7.1 Influência da aplicação tópica dos análogos na inflamação aguda por meio do modelo de edema de orelha**

Devido aos resultados promissores nos testes que sugeriram potencial anti-inflamatória *in vitro* para os análogos AR07, AR23, AR25 e AR33, estes foram avaliados *in vivo* pelo modelo agudo de edema de orelha induzido em camundongos BALB-c. Para isso, os animais foram desafiados com óleo de cróton em uma das orelhas e imediatamente tratados com os análogos. A diferença de massa entre as orelhas foi usada como medida da intensidade do edema. Conforme ilustrado na figura 16, a aplicação tópica na mesma concentração (0,1mg/orelha) do resveratrol (RVT) ou análogos inibiu o edema em cerca de 40% comparando-se ao controle negativo (inflamado e tratado apenas com o veículo). Neste modelo, a dexametasona (DXT), utilizada como controle, foi mais eficaz, reduzindo o edema em cerca de 90%. A diminuição do edema da orelha medida pela diferença de massa entre a orelha inflamada e a não-inflamada demonstrou que o resveratrol e os análogos apresentaram comportamentos estatisticamente iguais. As fotomicrografias confirmaram estes dados, sendo possível a visualização de um infiltrado inflamatório menor nos tecidos expostos aos compostos se comparado ao tecido que não recebeu tratamento específico (veículo). A dexametasona foi mais eficaz na diminuição do edema, reduzindo o edema cerca de dez vezes em comparação ao veículo e cerca de seis vezes em comparação aos análogos e ao resveratrol.

Em todos os tratamentos foi perceptível a redução do infiltrado de leucócitos, em comparação ao grupo sem tratamento específico (Figuras 15 e 16).



**Figura 15: Efeito da administração tópica de resveratrol (RVT) e análogos no edema auricular induzido por óleo de cróton.** O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de óleo de croton na superfície interna de cada orelha direita, seguido por tratamento. As orelhas esquerdas foram usadas como controle. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  DP das diferenças entre as massas das orelhas. Médias seguidas pela mesma letra minúscula são estatisticamente iguais (one-way ANOVA/Newman-Keuls,  $p < 0,01$ ).

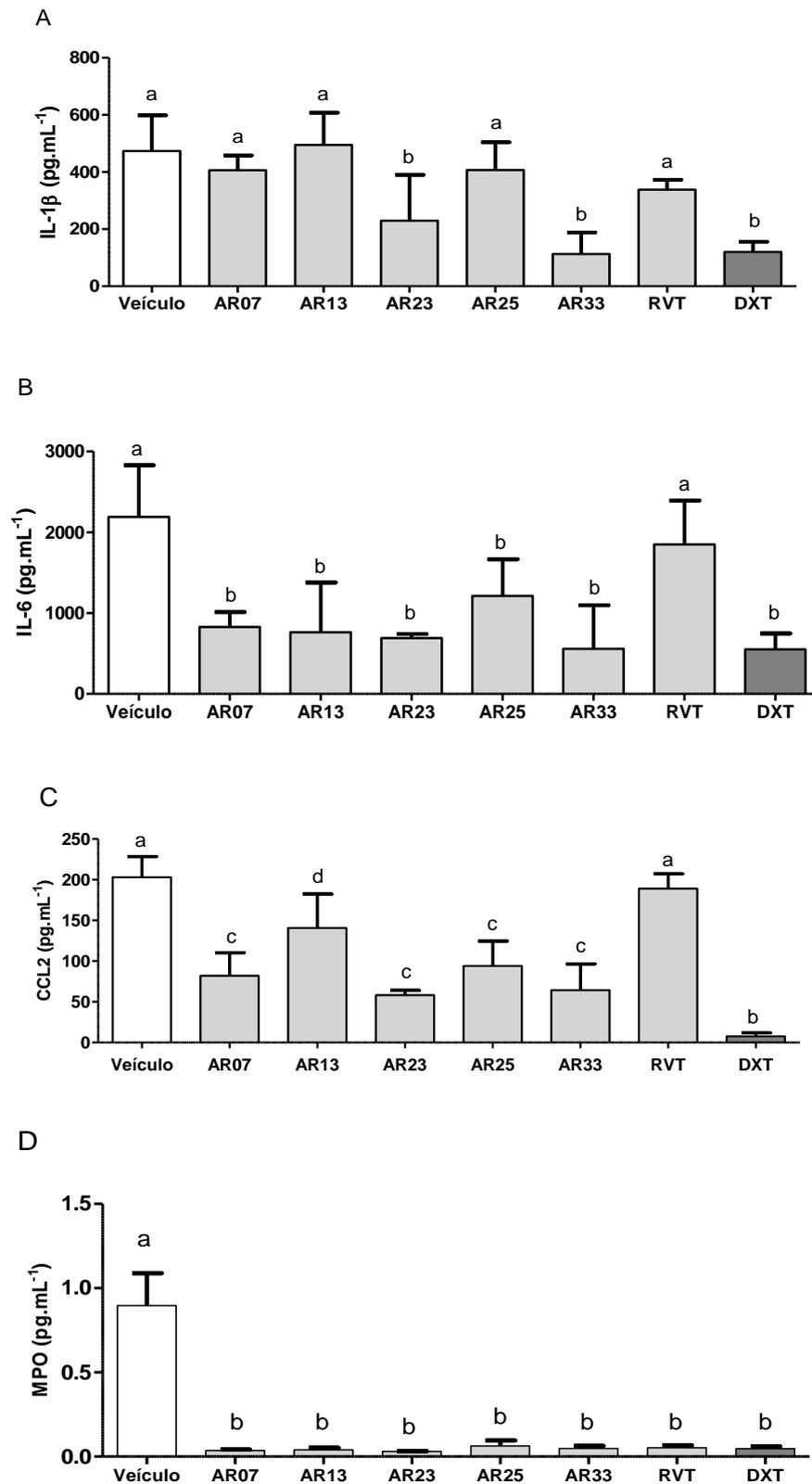


**Figura 16: Efeito da administração tópica de resveratrol e análogos no infiltrado inflamatório de camundongos submetidos ao modelo de edema auricular induzido por óleo de cróton.** O edema de orelha de camundongo foi induzido pela aplicação tópica de óleo de croton na superfície interna de cada orelha direita de camundongo, seguido por tratamento. Fotomicrografias representativas de seções de biópsias de orelha de camundongos. As imagens ampliadas 40X e 400X, respectivamente, representam os diferentes tratamentos: (A e B) Veículo; (C e D) AR07; (E e F) AR23; (G e H) AR25; (I e J) AR33; (K e L) Resveratrol; e (M e N) Dexametasona. É possível observar a diminuição do infiltrado inflamatório (pontos roxos na imagem) em todos os tratamentos, comparados ao veículo. Coloração por H & E.

Tais evidências de que os análogos exerceram atividade anti-inflamatória neste modelo, até então sugeridas pela diferença entre a massa das duas orelhas (inflamada e não inflamada) e por uma análise qualitativa das fotomicrografias, foram confirmadas pela avaliação de importantes citocinas relacionadas à inflamação aguda, tal como IL-1 $\beta$  e IL-6 e ainda IL-12, CCL2 e atividade da mieloperoxidase (Figura 17A, B, C e D).

Contrário ao esperado, somente os análogos AR23 e AR33 reduziram os níveis da citocina IL-1 $\beta$  em relação ao grupo não tratado (veículo). Essa redução foi estatisticamente igual à dexametasona (Figura 17A). Já os níveis de IL-6 foram reduzidos por todos os análogos também de forma comparável ao fármaco de referência. Neste caso, apenas o resveratrol não promoveu redução na concentração desta citocina. Em relação a quimiocinas CCL2, os análogos também foram capazes de reduzir estatisticamente a produção desta molécula, embora essa redução não tenha sido tão proeminente quanto aquela ocorrido após o tratamento com dexametasona.

Tratando-se da atividade da mieloperoxidase, enzima esta relacionada à participação dos macrófagos no processo inflamatório, foi observada uma drástica redução da mesma promovida por todos os análogos que foram estatisticamente iguais à redução obtida com o uso da dexametasona (Figura 17D). Este resultado corrobora o observado nas fotomicrografias (Figura 16), onde é nítida a diminuição do infiltrado inflamatório.



**Figura 17: Efeito da administração tópica dos análogos do resveratrol (RVT), resveratrol e dexametasona (DXT) na inflamação por modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. (A) IL-1 $\beta$ ; (B) IL-6; (C) CCL2; (D) Atividade da mieloperoxidase (MPX). Após 4h os animais foram eutanasiados, as orelhas foram**

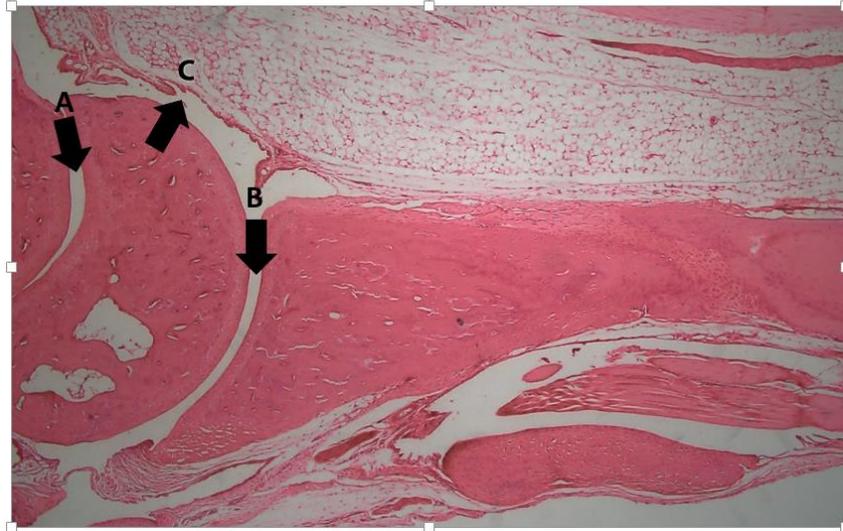
removidas e submetidas ao procedimento de extração de proteínas do tecido. Com o sobrenadante, foi conduzido o doseamento das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6, da quimiocina CCL2, por ELISA; e com o pellet, realizado o ensaio para determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO). Médias que apresentam a mesma letra minúscula são estatisticamente iguais (One-way ANOVA/Newman-Keuls,  $p < 0,01$ ).

#### 2.4.7.2 Influência dos análogos do resveratrol em modelo de artrite induzida por Zymosan

Visto que quatro análogos selecionados apresentaram bom desempenho na redução da inflamação em modelo de edema de orelha, o próximo passo foi avaliá-los em um modelo de doença inflamatória utilizando uma outra via de administração. Para isso, os compostos AR23 e AR33 foram selecionados uma vez que, além de reduzir o edema de orelha, foram efetivos em modular a produção de todas as citocinas avaliadas *in vivo*. Para esta nova análise foi selecionado o modelo de artrite induzida por Zymosan, no qual a inflamação articular é caracterizada por acentuada migração celular e liberação de mediadores inflamatórios que leva a incapacitação articular, sendo este um modelo útil para reproduzir as patologias agudas periarticulares (ROCHA *et al.*, 2003).

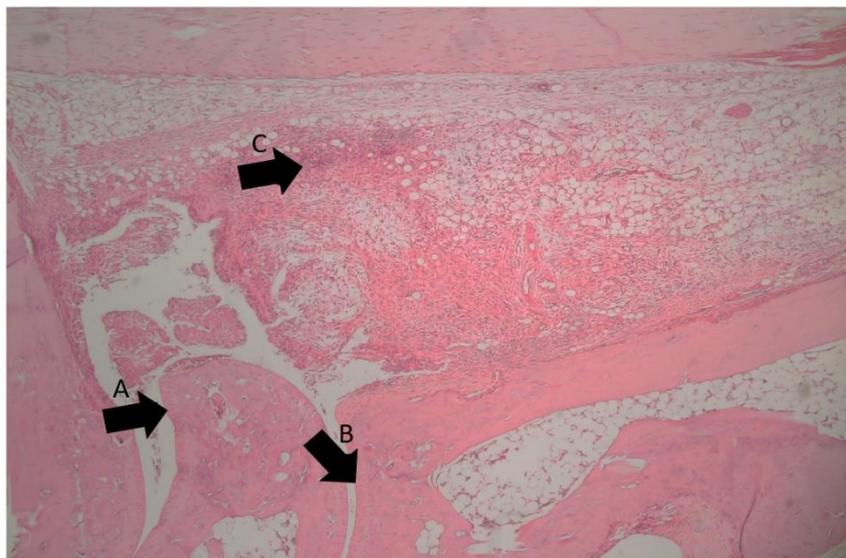
Antes de iniciar os tratamentos propostos, sinais clínicos referentes ao processo inflamatório, como edema, rubor e calor foram observados na região da articulação talocrural e subtalar nos grupos de animais que receberam a administração de zymosan intra-articular, confirmando o sucesso na indução da artrite, de modo idêntico ao apresentado por Anjos *et al.* (2015).

Os animais que não receberam a injeção de zymosan não demonstraram as mesmas alterações visuais e o padrão encontrado na análise histológica de suas articulações está apresentado na figura 18.



**Figura 18: Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal sem inflamação (controle limpo).** A seta 'A' indica a articulação talocrural; 'B' indica a articulação subtalar; 'C' indica a membrana sinovial. Coloração H&E. Aumento 4x.

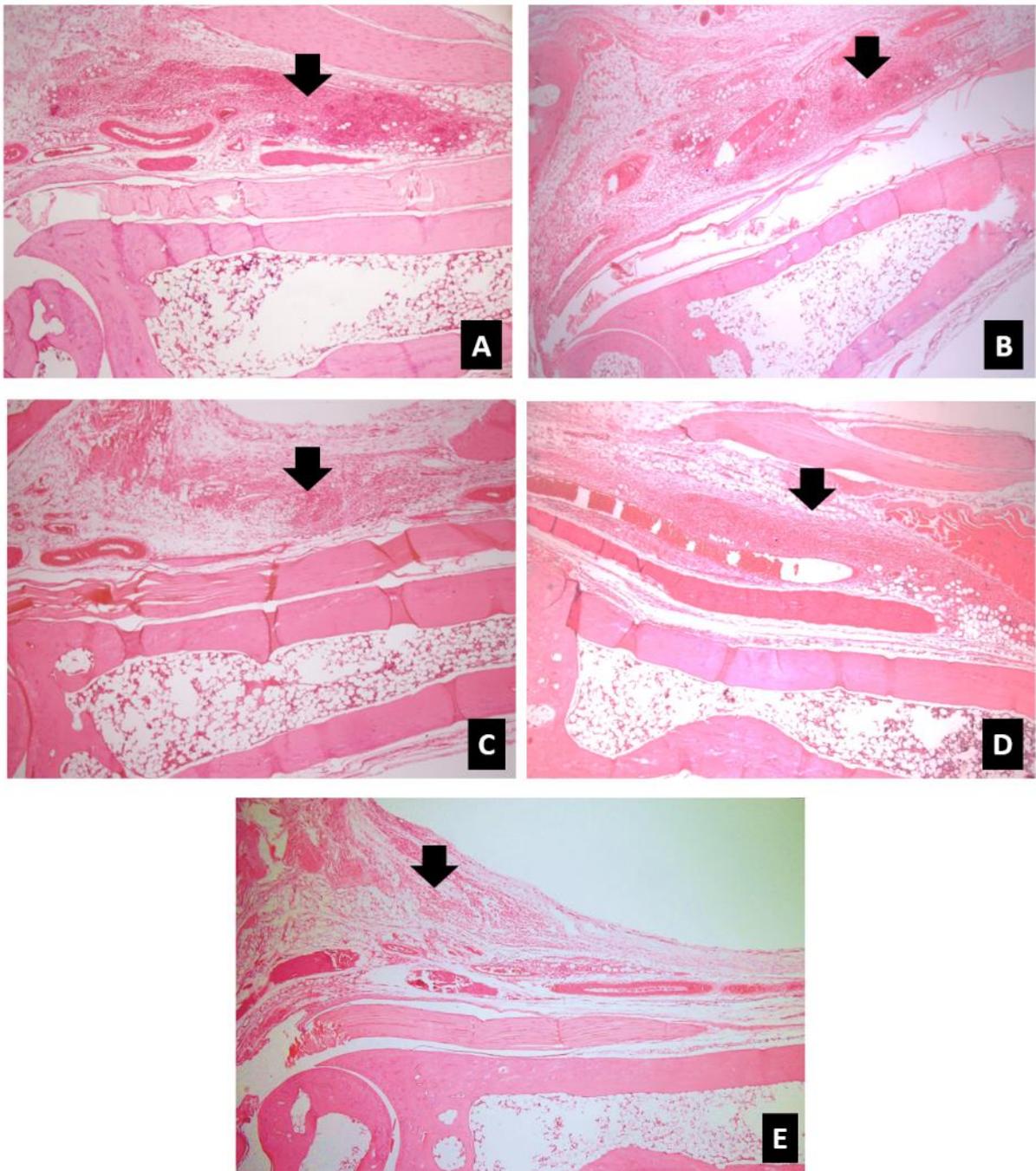
Em contrapartida, os animais submetidos ao modelo de artrite e não tratados demonstraram um padrão bem diferente na análise morfológica, permitindo a visualização de infiltrado inflamatório bastante denso em algumas áreas e marcante presença de tecido fibroso (Figura 19).



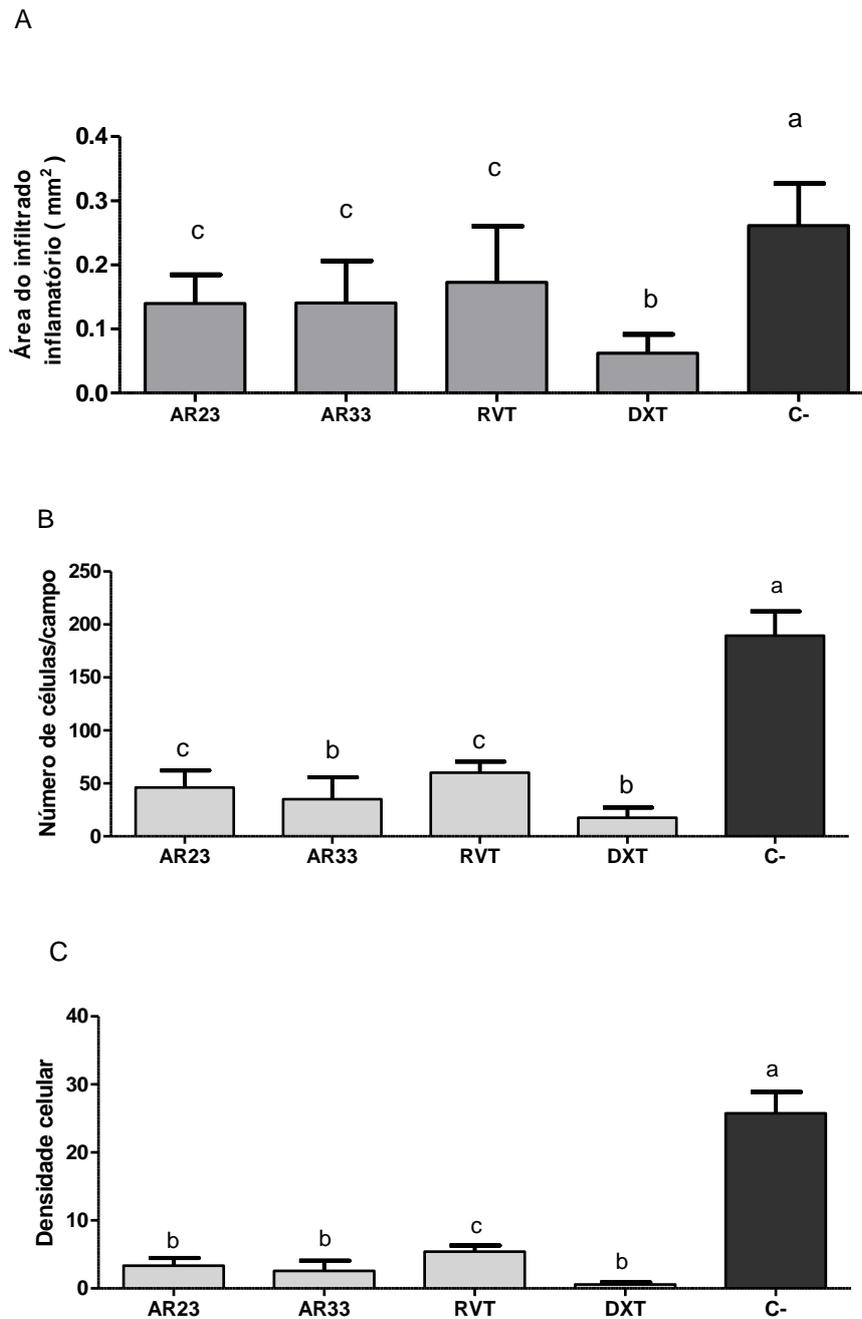
**Figura 19: Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal com inflamação e tratado com veículo (controle negativo).** A seta 'A' indica a articulação talocrural; 'B' indica a articulação subtalar; 'C' indica a área com denso infiltrado inflamatório e intensa fibrose. Coloração H&E. Aumento de 40x.

Após os cinco dias de tratamento, nos grupos com inflamação induzida por zymosan e tratados com os análogos, resveratrol ou dexametasona foi observada uma diminuição do infiltrado inflamatório (figura 20), confirmada pela redução de sua área (figura 21A), número de células por campo (figura 21B) e de sua densidade celular (figura 21C), comparados com os animais controle negativo.

A redução da área do infiltrado foi estatisticamente igual para AR23, AR33 e o resveratrol, sendo que os análogos reduziram esta área em cerca de 50% em comparação ao controle negativo. Já a dexametasona foi capaz de promover uma redução ainda mais pronunciada equivalente a cerca de 70%. Acompanhando este resultado, também foi verificada a redução no número de células por campo nos animais tratados com os análogos e o resveratrol, porém, neste caso, o AR33 produziu efeito estatisticamente comparável ao da dexametasona. Em consequência da redução deste último parâmetro, também foi percebida a diminuição na densidade celular do infiltrado inflamatório de modo que, nesta avaliação, ambos os análogos foram estatisticamente iguais à dexametasona. Cabe ressaltar que a diminuição da área total acompanhada pela diminuição da densidade celular do infiltrado inflamatório é uma alteração bastante promissora.



**Figura 20: Fotomicrografias demonstrando a morfologia da região articular dos animais dos grupos: A) Veículo (controle negativo); B) AR23; C) AR33; D) Resveratrol (RVT); E) Dexametasona (DXT) (controle positivo). A seta indica a área principal do infiltrado inflamatório e/ou fibrose. Coloração H&E. Aumento de 40x.**

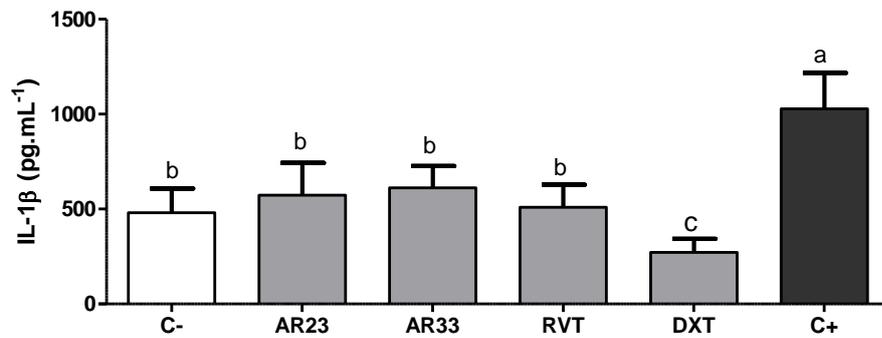


**Figura 21: Influência dos tratamentos com os análogos e o resveratrol em parâmetros inflamatórios da artrite induzida por Zymosan.**

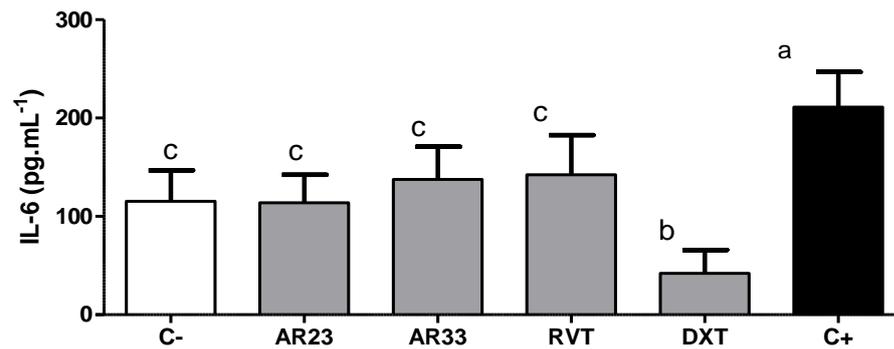
(A) área principal do infiltrado inflamatório; (B) número de células polimorfonucleares no infiltrado inflamatório; e (C) Densidade celular no infiltrado inflamatório principal. Médias seguidas pela mesma letra minúscula significam igualdade estatística (One-way ANOVA/Newman-Keuls,  $p < 0,01$ ). RVT – resveratrol. DXT – dexametasona. C- - controle não tratado.

Frente a estas alterações no perfil inflamatório dos animais tratados, foi realizada a dosagem das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  e da quimiocina CCL-2. Os resultados destas análises estão dispostos nos gráficos a seguir (Figura 22).

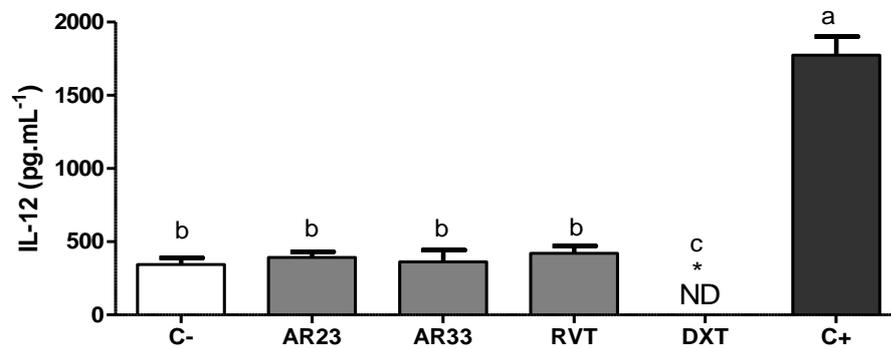
A

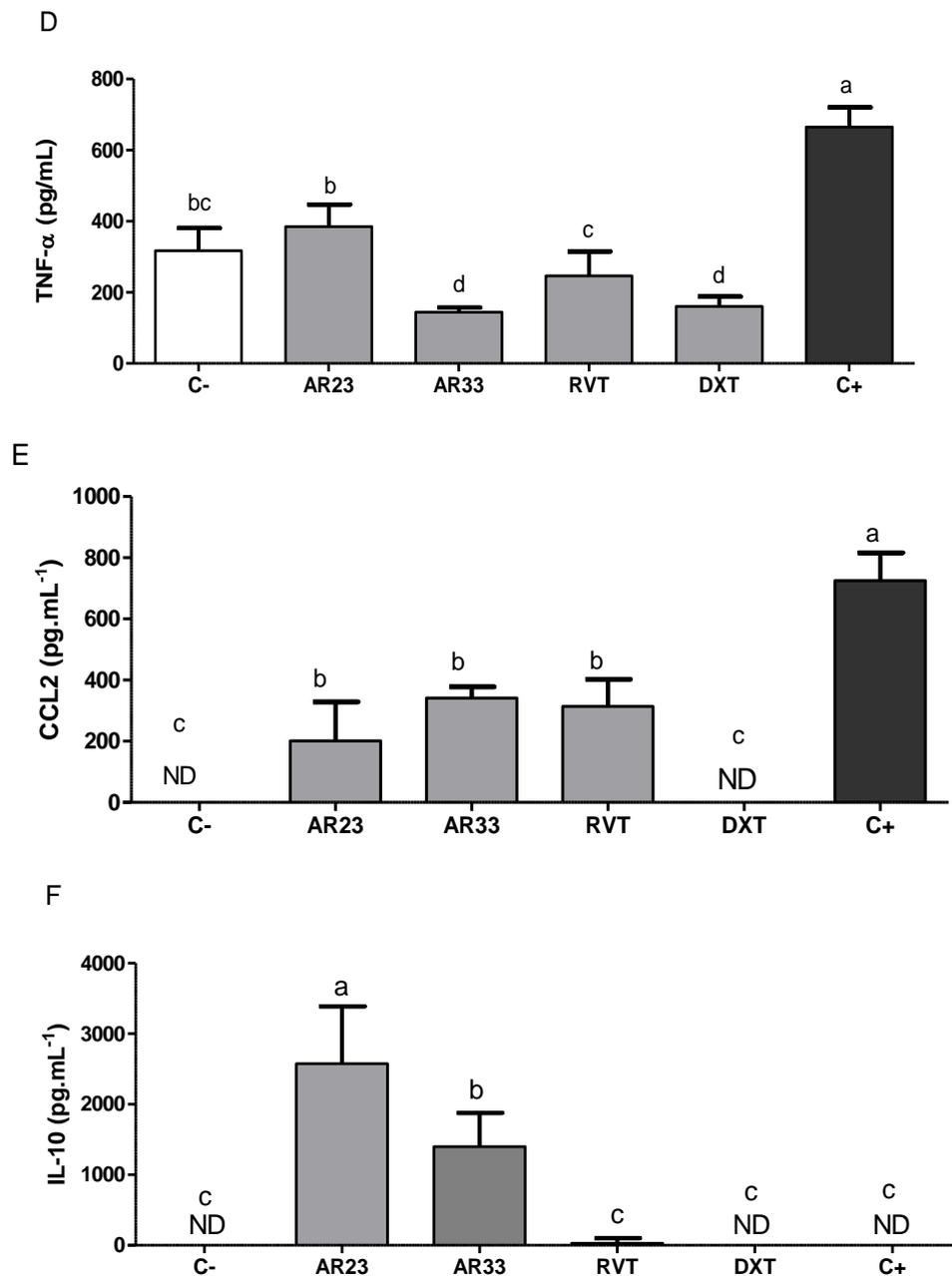


B



C





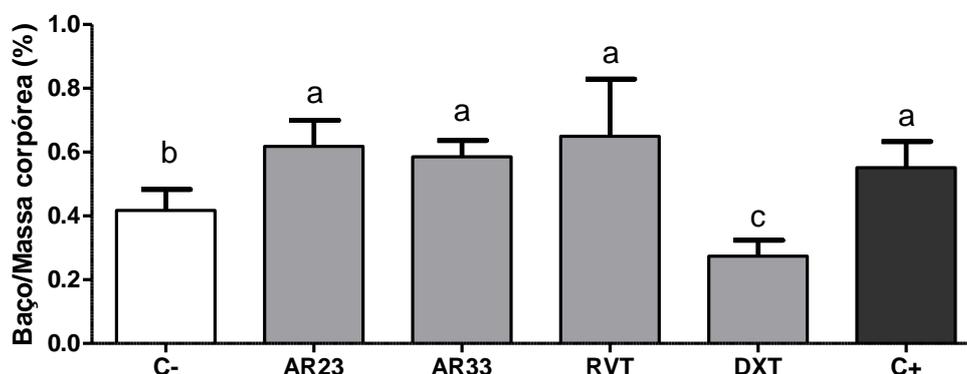
**Figura 22: Influência do tratamento com os análogos e resveratrol na artrite induzida por Zymosan.** (A) IL-1 $\beta$ ; (B) IL-6; (C) IL-12; (D) TNF- $\alpha$ ; (E) CCL<sub>2</sub>; (F) IL-10. Após a aplicação do Zymosan na articulação talo-crural de camundongos C57BL/6, aguardou-se por cinco horas quando então, iniciou-se o tratamento com os análogos AR23 e AR33 (50mg/Kg), resveratrol (RVT) (50mg/Kg) e dexametasona (DXT) (0,4mg/Kg). O tratamento teve duração de cinco dias, com uma aplicação intraperitoneal diariamente no mesmo horário. Ao final deste prazo, os animais foram eutanasiados e as patas recolhidas e encaminhadas para os procedimentos de extração de citocinas em tecido. A dosagem das citocinas e quimiocina foi feita por ELISA. O controle negativo (C-) consistiu em animais que não receberam a administração de zymosan e tratamento. O controle positivo (C+) foi composto por animais que desenvolveram artrite induzida por zymosan e que receberam veículo como tratamento. ND: não detectado, sendo considerado igual a zero. Médias

seguidas pela mesma letra minúscula representa igualdade estatística (One-way ANOVA/Newman-Keuls,  $p < 0,01$ ).

De acordo com os resultados obtidos e de acordo com os aqueles que já haviam sido demonstrados *in vitro*, percebeu-se uma tendência de os análogos reduzirem as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  em níveis estatisticamente iguais ao do controle sem artrite (C-). Com relação a quimiocina CCL2, apesar de não ter sido reduzida a concentrações estatisticamente iguais a apresentada pelo controle negativo, foi possível observar uma redução importante quando comparada ao controle positivo.

No entanto, de forma surpreendente e desejável, ao contrário do observado *in vitro*, houve um aumento significativo na produção da citocina imunomoduladora IL-10 nos animais que receberam o tratamento com os análogos AR23 e AR33, evento este que não foi percebido nos animais tratados com resveratrol e dexametasona.

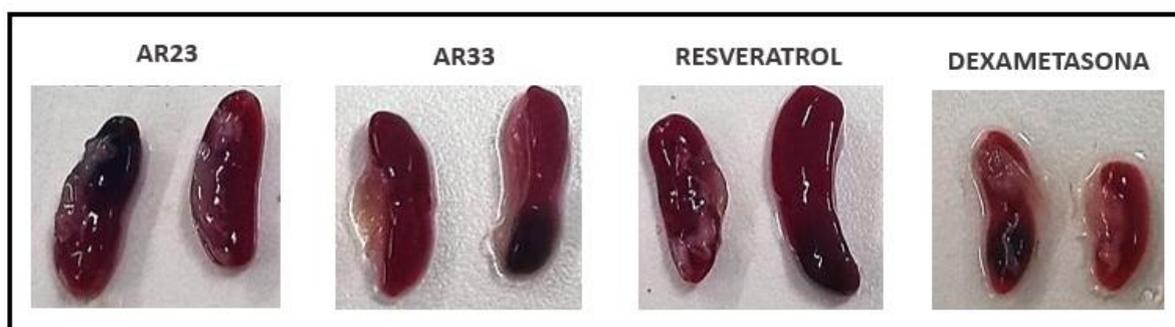
Sabe-se que a dexametasona é um glicocorticoide com efeito imunossupressor bem estabelecido utilizada no tratamento de diversas patologias inflamatórias de autoimunes (JANG *et al.*, 2017). No presente estudo, esta droga promoveu substancial redução de todas as citocinas, quimiocina e parâmetros inflamatórios avaliados. Frente a isso foi investigada a alteração que esta droga poderia causar ao baço, comparando-se aos tratamentos com análogos ou resveratrol. Para isso, uma relação massa do baço/massa corporal total foi estabelecida em animais sadios (C+), não-tratados (C-), tratados com análogos, resveratrol ou dexametasona (Figura 23).



**Figura 23: Influência do tratamento com os análogos AR23 e AR33, resveratrol (RVT) e dexametasona (DXT) na proporção do baço pela massa corpórea total.** Camundongos C57Bl-6 foram pesados e distribuídos nos grupos propostos. Após cinco dias de tratamento, os animais foram eutanasiados, os baços foram retirados e pesados. Com a massa do baço e a massa de cada animal foi calculada uma relação

proporcional entre estas duas medidas, expressa em percentual. O controle negativo (C-) consistiu em animais que não receberam a administração de zymosan e tratamento. O controle positivo (C+) foi composto por animais que desenvolveram artrite induzida por zymosan e que receberam veículo como tratamento. Médias seguidas pela mesma letra minúsculas representa igualdade estatística (One-way ANOVA/Newman-Keuls,  $p < 0,01$ ).

Conforme mostrado na figura 30, animais submetidos ao protocolo de artrite apresentaram um pequeno, mas significativo aumento na relação baço/massa corporal. O tratamento com o resveratrol ou análogos AR23 e AR33 pareceu não afetar essa relação, apresentando comportamento estatisticamente semelhante ao apresentado por animais não tratados. Em consonância com os resultados obtidos para citocinas, os baços do grupo tratado com dexametasona sofreram uma considerável redução, alcançando médias inferiores às do grupo controle negativo. Na figura 24, é possível perceber a diferença entre os baços do grupo resveratrol e do grupo dexametasona.



**Figura 24: Fotografia ilustrativa comparando os baços de camundongos C67BL/6 tratados com os análogos do resveratrol e tratados com dexametasona.**

Tais resultados sugerem que os análogos podem ser capazes de diminuir a manifestação e progressão da inflamação sem causar alteração tão evidente quanto a estabelecida para a dexametasona, oferecendo assim um tratamento eficaz e com reduzidos efeitos adversos.

## 2.5 DISCUSSÃO

O futuro dos agentes anti-inflamatórios reside no desenvolvimento de drogas ativas que reduzam a produção ou atividades de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, particularmente no que diz respeito ao tratamento do componente inflamatório das doenças degenerativas do envelhecimento, os medicamentos mais recentes precisam ter riscos mínimos de toxicidade de órgãos, garantindo que a defesa imune do hospedeiro contra infecções e câncer não sejam prejudicadas. Novos agentes que funcionam desta maneira estão em um estágio rápido de desenvolvimento, por exemplo, antagonistas de receptores de quimiocinas que possam ser ativos oralmente (DINARELLO, 2010). Neste sentido, o presente estudo foi desenvolvido em busca de análogos do resveratrol que apresentassem atividade anti-inflamatória, sobretudo avaliando-se o potencial imunomodulador destas novas potenciais drogas.

A avaliação inicial das tioiminas *in vitro* revelou que estas moléculas não demonstraram desempenho satisfatório no teste de viabilidade com células RAW 264.7, podendo atribuir seu caráter citotóxico à presença do grupamento tiol (-S). No caso das iminas, dentre os compostos sintetizados e testados nas condições apresentadas, o componentes desta classe (AR07, AR08, AR13, AR22, AR23, AR25 e AR26) não afetaram a viabilidade celular, atuando de modo semelhante ao resveratrol. Já as hidrazonas, nas condições testadas, apresentaram um perfil de toxicidade superior ao da classe das iminas, potencializada pela presença de grupamento éster (-OMe) (AR16), carboxilato (-COOH) (AR35), nitros (-NO<sub>2</sub>) (AR32 e AR39) e dinitro carboxilato (AR38). Já o AR33, a única hidrazona selecionada (cuja molécula não foi revelada devido a interesses futuros), apresenta funções químicas distintas das demais.

Cabe mencionar que a avaliação da influência dos compostos na viabilidade de células RAW 264.7, J774.A1 e macrófagos peritoneais refletiu indiretamente a ausência de citotoxicidade destes compostos tanto em células de linhagem, quanto em cultura primária. A técnica usada para isso foi a de MTT que, embora não seja uma medida direta de morte, tem boa correlação com este evento visto que se baseia em uma função bioquímica crítica que é a atividade mitocondrial, determinante para a vida da célula (MOSMAN, 1983; ALLEN e GRAHAN, 2012; RISS *et al.*, 2013).

Embora o mecanismo exato pelo qual o resveratrol exerça seus efeitos benéficos ainda não seja completamente compreendido, sua atividade antioxidante proeminente parece ser essencial, influenciando vias importantes relacionadas com a resposta imune, bem como a produção de EROs (GUTIERREZ-GUTIERREZ *et al.*, 2010; GUANTAI e CHIBALE, 2011). Conforme demonstrado, neste quesito os análogos foram mais eficientes do que o resveratrol. Dentre eles, AR08, AR13, AR26 e AR33 foram os de menor IC<sub>50</sub> no ensaio de captura do íon DPPH, porém foi possível perceber que a atividade anti-inflamatória não tem uma relação diretamente proporcional ao potencial antioxidante *in vitro*.

O melhor desempenho antioxidante geral dos análogos em comparação ao resveratrol pode ser explicado pela presença da hidroxila no anel A em posição orto, considerada como determinante para a otimização da atividade antioxidante colaborando para o isolamento do átomo dos radicais livres (LU *et al.*, 2012). Corroborando esta assertiva, estudos prévios do grupo demonstraram que três iminas sem hidroxila ou com esse grupamento em outra posição diferente da orto-dirigente tiveram seu poder antioxidante drasticamente reduzido quando avaliadas pelo mesmo ensaio aqui utilizado (IC<sub>50</sub>=2721,87 µM; 1577,80 µM e 403,87µM, respectivamente) (SANTOS *et al.*; 2013). Sendo assim, uma vez que já foi constatado que esta habilidade da molécula está relacionada à supressão da inflamação e à supressão do tumor, o potencial antioxidante pode guiar a elucidação do mecanismo pelo qual diversos análogos do resveratrol apresentam propriedades biológicas, em especial aqueles que apresentam a hidroxila em posição orto-dirigente (TANG *et al.*, 2013).

Tendo em vista o potencial anti-inflamatório dos análogos do resveratrol até aqui sugeridos pela analogia com a molécula precursora e pelo poder antioxidante dos mesmos, a presente pesquisa se concentrou, principalmente, na investigação de como os análogos influenciariam alguns aspectos do funcionamento de macrófagos. A escolha em especial destas células deveu-se à sua alta sensibilidade à estimulação por LPS com a produção de diversos mediadores inflamatórios como NO, citocinas e quimiocinas, que são amplamente responsáveis por muitos dos eventos fisiopatológicos associados a doenças inflamatórias (QURESHI *et al.*, 2011a; QURESHI *et al.*, 2011b; QURESHI *et al.*, 2011c; QURESHI *et al.*, 2012). Sendo assim, a modulação de respostas inflamatórias mediadas por macrófagos pode ser vista como uma das formas direcionadoras de uma nova abordagem terapêutica no contexto das doenças inflamatórias (ZONG *et al.*, 2012).

Neste contexto, a análise qualitativa e global dos mediadores inflamatórios avaliados no presente estudo revelou que os análogos exibiram potencial para modular a resposta inflamatória, haja vista a capacidade dos mesmos em reduzir pelo menos oito dos quatorze parâmetros avaliados que são cruciais para estabelecer um processo inflamatório. O resveratrol apresentou comportamento semelhante, reduzindo nove parâmetros.

Na tentativa de descrever o mecanismo pelo qual o resveratrol exerce sua ação anti-inflamatória, Svajger e Jeras (2012) relataram que esta molécula pode inibir diversos caminhos relacionados com a resposta inflamatória como a via dos fatores de transcrição AP-1 e NF- $\kappa$ B e vias proteassômicas. Ao inibir tais vias, o resultado visto é a diminuição na produção de citocinas, principalmente IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , de enzimas como COX-2 e iNOS e moléculas de adesão endotelial (TAK e FIRESTEIN, 2001; TSAI, LIN-SHIAU e LIN, 1999; QURESHI *et al.*, 2012). Pelo fato de os análogos apresentarem estruturas muito semelhantes ao resveratrol, é plausível supor que também atuem em vias semelhantes. Apesar disso, mais aprofundados são necessários para confirmar essa proposição.

Enfocando um pouco mais em cada um dos parâmetros inflamatórios avaliados e iniciando-se pela drástica diminuição da concentração de nitritos (medida indireta de NO) encontrada em culturas pré-estimuladas e expostas aos análogos, observou-se que, apesar de a ação do resveratrol na redução da expressão da enzima iNOS já ser esperada e bem estabelecida, os análogos reduziram este mediador de modo mais intenso do que o resveratrol. Tais resultados sugerem que os compostos têm uma maior potência de inibição na enzima iNOS ou que agem por um mecanismo diferente ou adicional ao proposto para o resveratrol, tal como a inibição da enzima NOS-2 ou neutralização direta de NO, tendo em vista que esta pequena molécula funciona como um radical livre, além de vias de sinalização (BOORA, CHIRISA e MUKANGANYAMA; 2014). Zhong *et al.* (2013) investigaram a ação de diferentes análogos do resveratrol na produção de NO e concluíram que análogos metilados foram mais eficazes que o composto original, sendo alguns deles capazes de inibir iNOS induzida por LPS e a produção de NO através das vias de sinalização p38 MAPK e JNK1/2. No caso dos análogos testados, todos foram capazes de reduzir o NO quando comparados ao controle estimulado (LPS+IFN- $\gamma$ ) e ao resveratrol, porém, na comparação entre eles, apenas o AR33 distinguiu-se dos demais demonstrando uma menor potência nesta atividade na concentração de 50 $\mu$ M. Cabe ressaltar que esta

molécula é a única hidrazona dentre as selecionadas e que isso pode demonstrar uma interferência na ação inibidora de NO, ainda que também seja capaz de reduzi-lo.

Embora o NO seja uma importante defesa tóxica contra organismos infecciosos e regulador de outras atividades funcionais, é capaz de causar a morte de muitos tipos de células imunes e inflamatórias. Sua ação também é útil para destruir patógenos e aumentar a resposta inflamatória em várias doenças, incluindo patologias autoimunes (COLEMAN, 2001). Assim, a redução da concentração de NO tem uma implicação direta na redução da inflamação e de seu dano.

Esse perfil de redução dos mediadores inflamatórios apresentado pelos análogos foi mantido frente a maioria das citocinas testadas. Segundo Qureshi *et al.* (2012), o resveratrol, bem como outros estilbenos, são capazes de inibir a ativação da via do NF- $\kappa$ B em células RAW 264.7, suprimindo a ativação de citocinas fundamentais para uma resposta pró-inflamatória. Essa assertiva corrobora os resultados encontrados *in vitro*, marcados pela diminuição na secreção de IL-1 $\beta$  e IL-6 por todos os análogos e de TNF- $\alpha$  pelo AR07, AR22, AR23, AR25 e AR33 em resposta a estímulos (LPS) adicionados às culturas antes de receberem os tratamentos propostos. O resveratrol, por sua vez, foi capaz de reduzir os níveis destas três citocinas mencionadas, em consonância com outros estudos (SHAKIBAEI *et al.*, 2007; TROTTA *et al.*, 2015; ZAGOTTA *et al.*, 2015).

Em concordância com os resultados apresentados, Cianciulli *et al.* (2015) demonstraram que o pré-tratamento de células da micróglia com resveratrol também foi eficaz para a redução dos níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Tais citocinas ainda podem ser destacadas como citocinas de imunidade inata cruciais para iniciar o evento inflamatório (STRIZ *et al.*, 2014). Entretanto, Cianciulli *et al.* (2015) também constatou um aumento na produção de IL-10 após o tratamento com resveratrol, o que não ocorreu para sete dos oito análogos e para o resveratrol nas condições testadas. Em contrapartida, Rachón, Rimoldi e Wuttke (2006) também não observaram diferença significativa na capacidade de o resveratrol aumentar os níveis de IL-10. Acredita-se que estas discrepâncias podem ser justificadas levando-se em conta o tipo de célula estudada e, principalmente, a forma de tratamento (exposição às drogas antes ou depois de estimular as células).

Em relação ao TNF- $\alpha$ , diversos autores demonstraram que o resveratrol é capaz de reduzir a produção desta citocina em uma ampla gama de tipos celulares tais como células da micróglia (macrófagos cerebrais), da musculatura lisa vascular,

células endoteliais, RAW 264.7, etc. (BI *et al.*, 2005; LEE e MOON, 2005; MA *et al.*, 2005; MOON *et al.*, 2006; YI *et al.*, 2011). Para Babu *et al.* (2015), além de diminuir TNF- $\alpha$ , o resveratrol oferece um efeito citoprotetor às células por atenuar a produção de EROs. Ryu *et al.* (2011) completaram que a inibição na produção desta citocina pode estar relacionada a uma diminuição na ativação da via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Além disso, estudos anteriores sugeriram que o resveratrol inibe a ativação desta via por ocupar o sítio de ligação para a porção promotora de IL-1 $\beta$  (O'NEILL, 1995; DINARELLO, 1996 e HOLMES-MCNARY E BALDWIN, 2000).

De forma também condizente aos resultados aqui apresentados, Estrov *et al.* (2003) verificaram uma diminuição na produção de IL-1 $\beta$ , bem como diminuição na ativação de NF- $\kappa$ B em células de leucemia mielóide aguda. Ma *et al.* (2005) corroboraram este achado demonstrando a diminuição de IL-1 $\beta$  em macrófagos peritoneais tratados com resveratrol, bem como a diminuição de outros fatores pró-inflamatórios, como iNOS e TNF- $\alpha$ . Assim também foram os resultados encontrados por Shakibaei *et al.* (2007) ao observarem que o resveratrol exerceu uma ação protetora sobre condrócitos ao bloquear os efeitos de IL-1 $\beta$  na ativação de caspase-3 e outras ações que levam a apoptose de tais células. Além disso, Chang *et al.* (2015) demonstrou que o resveratrol é capaz de inibir o complexo multiproteico associado a caspase-1 denominado inflamassoma, que também regula a produção de IL-1 $\beta$ .

Sendo assim, mesmo não havendo aumento nos níveis de IL-10 que tende a exercer um caráter imunossupressor, a diminuição de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  pela maioria das moléculas avaliadas já sugere um potencial anti-inflamatório considerável, condizente aos dados encontrados na literatura para o resveratrol. Estes resultados ganham ainda mais valor se avaliado o perfil de muitas doenças inflamatórias onde estas três citocinas são cruciais para a progressão e manutenção do processo patológico (BUTLER *et al.*, 1995; BOUMA e STROBER, 2003; BURGER *et al.*, 2006; BOISSIER, 2011; RYU *et al.*, 2011).

Acerca da produção de IL-12, observou-se que todos os análogos foram mais potentes em sua redução do que o resveratrol, reduzindo a mesma para níveis basais. A IL-12 é uma citocina heterodimérica crítica para a diferenciação das células T<sub>H1</sub> e consequente produção de IFN- $\gamma$  (TRINCHIERI, 2003). Vários estudos demonstraram que a IL-12 é importante para manter ativas diversas doenças auto-imunes, tais como esclerose múltipla, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e outros

(LONGBRAKE e RACKE, 2009; POPE e SHANRARA, 2013; SUN *et al.*, 2015; OUYANG *et al.*, 2017). Assim, a redução substancial de IL-12 induzida por análogos de resveratrol sugere um efeito benéfico no controle destas patologias e outras correlacionadas. Além disso, considerando que a subunidade IL-12p40 (avaliada no presente estudo) é também parte da IL-23, que por sua vez é importante para a manutenção das células T<sub>H</sub>17, estes resultados sugerem que os análogos podem ser capazes de modular tanto o perfil T<sub>H</sub>1, quanto o T<sub>H</sub>17 (TRINCHIERI, 2003; IWAKURA, 2006). Esta inferência está de acordo com Imler e Petro (2009) ao demonstrarem que o resveratrol diminui a gravidade do modelo animal de esclerose múltipla e que este efeito foi associado à redução da subunidade IL-12p40, IL-6 e IL-23.

Tratando-se de produtos de macrófagos, a redução na concentração da quimiocina CCL2, envolvida com o recrutamento de monócitos para o tecido inflamado, foi substancial por todos os análogos, abrindo outra possibilidade pela qual estes compostos agem sinergicamente para a resolução do quadro inflamatório. Esta quimiocina é produzida por diversos tipos celulares, mas os macrófagos e monócitos são a principal fonte desta substância. Além de regular a migração e infiltração de monócitos, CCL2 também tem a mesma ação sobre linfócitos T de memória e NK, constituindo uma das quimiocinas mais estudadas e que vem demonstrando ser um ponto de intervenção potencial para o tratamento de várias doenças, incluindo a esclerose múltipla (SORENSEN *et al.*, 2004), a artrite reumatóide (HAYASHIDA *et al.*, 2001), aterosclerose (KUSANO *et al.*, 2004), dentre outras. O resultado encontrado neste estudo para os análogos e o resveratrol correspondente a redução da quimiocina CCL2 está de acordo com dados prévios da literatura demonstrados para o resveratrol (KNOBLOCH *et al.*, 2014).

No contexto de citocinas produzidas por células da imunidade adquirida, foi avaliado o IFN- $\gamma$ . De acordo com Gao *et al.* (2001), o resveratrol inibe a produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , bem como a proliferação de células do baço induzidas pela Con-A, IL-2, ou aloantígenos (GAO *et al.*, 2001). O IFN- $\gamma$  é uma citocina basicamente produzida por linfócitos T e células NK estimulados por IL-12 em especial, fundamental para manter a inflamação, potencializando a função dos macrófagos e permitindo que o quadro inflamatório evolua para a cronicidade (SCHRODER *et al.*, 2004). Dentre os análogos avaliados, os mais efetivos em reduzir os níveis desta citocina foram o AR13, AR22, AR23 e AR33, bem como o resveratrol. A diminuição na capacidade de produzir

o IFN- $\gamma$ , juntamente com a redução observada no índice de proliferação de LT, se mantidos *in vivo*, podem resultar em uma significativa diminuição na ativação dos macrófagos e consequente redução de patologias associadas à ativação contínua desta célula.

Conforme comentado, os compostos foram eficazes em reduzir o índice de proliferação celular de esplenócitos estimulados com ConA, mitógeno para LT (SHARMA *et al.*, 2007). Assim sendo, os análogos AR07, AR23, AR25, AR33, bem como o resveratrol foram ativos ao ponto de reduzirem o índice de proliferação para níveis basais (iguais ao controle não estimulado). Um efeito similar também foi observado nos esplenócitos estimulados com LPS, tido como um mitógeno de células B (SHARMA *et al.*, 2007), porém, neste caso, os AR13, AR22 e resveratrol não promoveram uma diminuição significativa neste índice. Estes resultados foram coerentes com aqueles encontrados para o resveratrol por Jiang *et al.* (2010) e Castino *et al.* (2011). A possibilidade de se reduzir o índice de proliferação dos linfócitos é desejável para substâncias cujo propósito seja o tratamento de doenças autoimunes ou mesmo para evitar rejeição de órgãos e medula transplantados (HUSHMENDY *et al.*, 2009). Se tal atividade for mantida *in vivo*, os análogos ativos são capazes de modular a resposta celular e humoral pela redução da proliferação de células T e B. Esta redução da proliferação induzida pelo resveratrol e a maioria de seus análogos pode ser associada às suas propriedades antioxidantes proeminentes já discutidas, uma vez que EROs podem influenciar na proliferação e na produção de fatores de crescimento (TATLA *et al.*, 1999; DE LA FUENTE e VICTOR, 2000). Apesar disso, a ação do resveratrol e análogos em outras vias, como na produção de IL-2, não pode ser descartada.

Contudo, ao se pensar em um organismo vivo com redes de interação muito mais complexas entre as células do sistema imune, é preciso ainda levar em conta outros fatores que podem influenciar na proliferação de linfócitos, tais como a inibição da via NF-kB, bem como a sincronia fundamental que ocorre entre linfócitos e macrófagos, seja pela produção de citocinas que poderia estar afetada sob ação dos análogos, seja por estes compostos serem capazes ainda de modificar a dinâmica que envolve a apresentação do antígeno ao LT (LIPSKY e ROSENTHAL, 1973; GAO *et al.*, 2001; ALISI *et al.*, 2017).

No contexto da apresentação de antígenos pelos macrófagos e ativação/inibição da atividade linfocitária, o MHCII e as moléculas coestimulatórias

CD80 e CD86 desempenham um papel fundamental e sua ausência pode anular a função imunológica (KEIR e SHARPE, 2005). Neste estudo, os análogos, com exceção do AR08, foram capazes de diminuir a expressão de CD80 e, com exceção de AR08, AR13 e AR22, os demais também reduziram a expressão de CD86. Já o MHCII foi reduzido somente pelos análogos AR23 e AR33, sendo esta atividade um diferencial de tais análogos. Estes resultados sugerem que os análogos (exceto AR08) podem suprimir ou diminuir a ativação de células T por regulação descendente de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86. Além do mais, os AR23 e AR33 poderiam interferir não só na co-estimulação dos linfócitos como também na apresentação do antígeno para o LT virgem, impedindo assim sua ativação. Pautado nesta premissa, o presente estudo sugere mais um rumo promissor no tratamento de doenças autoimunes ou reações de hipersensibilidade pelos análogos do resveratrol.

Em sintonia com o presente estudo, Sharma *et al.* (2007) também observaram uma redução na expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em macrófagos estimulados e tratados com resveratrol, demonstrando que esta diminuição acontece de maneira dose-dependente. Resultados semelhantes também foram encontrados por Wang *et al.* (2015) em células dendríticas estimuladas com ovalbumina (OVA), porém utilizando o tratamento prévio à estimulação. Já Svajger, Obermajer e Jeras (2010), ao tratar células dendríticas com baixas doses de resveratrol (10 ou 50  $\mu\text{M}$ ), percebeu que as mesmas perdiam a capacidade em produzir IL-12p70 e aumentavam a produção de IL-10, além de diminuir a expressão de CD40, CD80, CD86 e MHCII. Esses achados, associados aos resultados do presente estudo, reforçam o caráter imunomodulador associado ao resveratrol e seus análogos.

Foi verificado também que, com exceção de AR33 e resveratrol, os análogos são capazes de aumentar a expressão de CTLA-4 em LT e LB. Em LT, a molécula CTLA-4 está relacionada ao declínio da função celular e ativação de vias apoptóticas (QUANDT *et al.*, 2007). Em LB, embora ainda não tenha sido completamente elucidado, uma das consequências no aumento da expressão da expressão desta molécula consiste em uma menor produção de anticorpos na resposta dependente de LT contra aloantígenos (QUANDT *et al.*, 2007; YOUNG *et al.*, 2016). Com o aumento de sua expressão promovida pelos análogos abriu-se outra possibilidade para a regulação descendente da resposta inflamatória.

Diante dos dados obtidos *in vitro* foi possível discernir os análogos mais promissores sob o aspecto de diminuição/modulação da resposta imune, sendo eles o AR07, o AR23, o AR25 e o AR33. Um diferencial do presente estudo que merece atenção é a aplicação do tratamento após a estimulação das células. Este protocolo foi escolhido visto que a intenção é controlar um processo inflamatório já estabelecido. Em diversos estudos com o resveratrol o que se observou foi a aplicação do(s) composto(s) antes do estímulo, o que configura um caráter profilático (SHARMA *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2015).

Assim sendo, estes compostos destacados foram testados no primeiro modelo *in vivo* abordado no presente estudo: edema de orelha murino. Conforme demonstrado, o tratamento do edema de orelha com os análogos AR07, AR23, AR25 e AR33 exibiram resultados muito semelhantes ao resveratrol: sendo capazes de reduzir o edema, diminuir o acúmulo de células inflamatórias, reduzir a produção de IL-6, CCL2 e a atividade de MPO. Uma especial atenção foi dada aos análogos AR23 e AR33 que foram os únicos capazes de promover ainda a redução de IL-1 $\beta$ , já que este foi um resultado diferente do comportamento *in vitro* descrito para os análogos onde todos foram capazes de diminuir a concentração de tal citocina. É importante ressaltar que todos estes parâmetros avaliados são de suma importância na iniciação e manutenção da resposta inflamatória inata. Sendo assim, uma vez diminuídos pela ação dos análogos, reduz-se também o risco de que este evento evolua para a cronicidade ou gere qualquer outra complicação mais danosa ao tecido. Voltando-se o olhar para as doenças inflamatórias, os compostos em questão vão se tornando cada vez mais promissores na composição de novas alternativas no tratamento destas doenças. Além disso, conforme demonstrado por Pinto *et al.* (2015), o óleo de cróton é um agente flogístico capaz de ativar diversas vias relacionadas a inflamação, tais como a do NF- $\kappa$ B e AP-1, causando aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, migração de leucócitos, libertação de histamina e serotonina e aumento dos níveis de eicosanóides sintetizados pelas enzimas COX e 5-lipoxigenase (5-LOX). Assim, a redução do edema induzida pelos análogos sugere que os compostos sejam capazes de atuar nestas vias do processo inflamatório que não foram investigadas neste estudo, mas para as quais o resveratrol já demonstrou capacidade de inibição, conforme mencionado anteriormente.

Outro ponto que deve ser mencionado com relação ao modelo de edema de orelha foi o fato de ter sido observado efeito por meio da aplicação tópica dos

análogos. Considerando este resultado e extrapolando para a futura elaboração de uma forma farmacêutica tópica voltada para certas desordens inflamatórias humanas ou veterinárias, teria-se a vantagem de esta ser descrita como uma via segura, cômoda, com efeitos possíveis de serem limitados à área exposta e, portanto, com menos riscos de reações adversas/efeitos colaterais (JORGE, FERES e TELES, 2011; DIMASSI *et al.*, 2016). Além disso, a via tópica extingue a perda da droga sofrida pelo metabolismo de primeira passagem, como ocorre por via oral, por exemplo, e que não é desejável para compostos de baixa biodisponibilidade como no caso do resveratrol (ZETNER, ANDERSEN e ROSENBERG, 2016). Uma desvantagem desta via de administração é que ela não contempla possíveis melhorias na biodisponibilidade devido a mudanças estruturais presentes nos análogos. Assim, o efeito semelhante observado no tratamento com os análogos e com o resveratrol poderiam ser completamente diferentes caso as drogas fossem administradas por outras vias. Mais estudos serão realizados a fim de realizar estas comparações.

Uma especial atenção foi dada aos análogos AR23 e AR33 que foram os únicos capazes de promover *in vivo*, a redução da citocina IL-1 $\beta$ . Diante deste comportamento favorável destes análogos, os mesmos foram submetidos a outro modelo de inflamação, sendo escolhido o de artrite induzida por zymosan. Este último se diferiu do edema de orelha, basicamente, pelo tempo de inflamação, via de administração e doses utilizadas. No modelo de artrite, verificou-se que os análogos tiveram atividade muitas vezes comparável ao da droga de referência, a dexametasona, como na avaliação da área do infiltrado inflamatório, número de células inflamatórias por campo (apenas AR33), densidade celular e redução da concentração de TNF- $\alpha$  (apenas AR33). Nos parâmetros IL-1 $\beta$ , IL-12, CCL2 e TNF- $\alpha$  (para AR23) observou-se reduções muitas vezes equivalentes ao controle negativo.

Um resultado surpreendente encontrado no modelo de artrite foi o aumento considerável na produção de IL-10 no grupo tratado com o AR33 e maior ainda naqueles que receberam o AR23, o que não havia sido observado nas análises *in vitro*. Estes resultados podem indicar que o contato prolongado com os análogos AR23 e AR33 seja capaz de induzir a produção deste mediador ou que outros tipos de células presentes na resposta *in vivo* (tais como células regulatórias), sejam estimuladas pelos compostos a produzirem IL-10. Outra hipótese plausível seria a formação de metabólitos ativos de AR23 e AR33. Mais estudos deverão ser realizados a fim de averiguar estas hipóteses.

Esse conjunto de atuações apresentado pelas novas moléculas estão de acordo com o resultado obtido por Coradini *et al.* (2015) que testou a ação do resveratrol co-encapsulado em nanocápsulas em ratos com artrite induzida por Adjuvante de Freud Completo. No estudo mencionado, a proteção da molécula permitiu que o resveratrol exibisse seus efeitos anti-inflamatórios: diminuição da fibrose, do infiltrado inflamatório, do dano ósseo e cartilaginoso, fazendo com que a histologia dos animais tratados ficasse muito semelhante à de animais saudáveis.

Os tratamentos disponíveis atualmente para doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes consistem, basicamente, em drogas imunossupressoras, além de alguns destes tratamentos serem altamente custosos e relacionados à marcantes reações adversas e efeitos colaterais (CHINEN e BUCKLEY, 2010). Sabendo desta forte influência que a dexametasona poderia causar aos animais que receberam a mesma, foi avaliado um achado bastante interessante durante a eutanásia dos animais em relação àqueles tratados com os análogos ou o resveratrol: a atrofia do baço. Esta avaliação demonstrou que o glicocorticoide mais prescrito e usado para o tratamento e alívio da dor de causas diversas foi capaz de reduzir cerca de 35% do tamanho do baço comparado ao animal saudável e 50% comparado ao baço do animal não tratado ou que recebeu análogos/resveratrol como tratamento (VYVEY, 2010). Este dado pode ser diretamente relacionado à gravidade da imunossupressão típica do tratamento com glicocorticoides e, mais uma vez, os análogos em estudo demonstraram ter potencial para futuras investigações que os conduzam para a elaboração de novos medicamentos com potencial anti-inflamatório.

A interpretação dos resultados *in vitro* e *in vivo* permitem elucidar uma ação geral destes análogos que, primariamente, afetariam a resposta imune inata através da diminuição da produção de NO, das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e da quimiocina CCL2. Desta forma, a redução de tais mediadores inflamatórios diminuiriam a ativação de outras células da imunidade inata, seu recrutamento, mobilização para o tecido afetado e proliferação, liberação de DAMPs que amplificam ainda mais a resposta inflamatória e ativação da via do NF- $\kappa$ B (influenciado, inclusive, pelo potencial antioxidante). Um achado *in vivo* ainda demonstrou a capacidade de alguns compostos reduzirem a MPO e assim, o dano causado pelos neutrófilos. Em um próximo nível, a capacidade que os análogos tiveram de diminuir a expressão de coestimuladores da família B7 em macrófagos implicaria na redução da capacidade de ativação de linfócitos T por tais APCs. Os análogos AR23 e AR33, além disso,

seriam capazes de interferir no mecanismo de apresentação do antígeno via MHCII, por diminuir a expressão deste complexo em macrófagos. O aumento na expressão de CTLA-4, por outro lado, contribuiria para o declínio da resposta gerada pelos linfócitos que fossem ativados. Assim, há a possibilidade de se diminuir drasticamente a ativação da imunidade adquirida, tendo em vista que ainda houve uma diminuição no índice de proliferação de células T e B englobando, portanto, imunidade celular e humoral. Cabe lembrar que ao reduzir a produção de anticorpos, interfere-se na capacidade de opsonização do alvo em questão, diminuindo a atividade dos fagócitos. Outras alterações na imunidade adquirida podem ser oriundas da redução na concentração das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$ , fundamentais para manter o *link* entre macrófagos e linfócitos T, sem as quais se dificulta a cronificação do quadro inflamatório.

## 2.6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que oito análogos selecionados apresentavam potencial anti-inflamatório igual ou superior ao do resveratrol. Dentre eles se destacaram os compostos AR07, AR23, AR25 e AR33 que também se mostraram eficazes *in vivo*. Dois destes análogos, AR23 e AR33 demonstraram ser moléculas promissoras para serem utilizadas em desordens inflamatórias.

*CÂNCER E ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS ANÁLOGOS DO  
RESVERATROL*

## CAPÍTULO III

### 3.1 NEOPLASIAS MALIGNAS

As neoplasias malignas, popularmente conhecidas como câncer, tratam-se de um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, resultante de mutações causadas pelos carcinógenos. Cerca de 5% a 10% das neoplasias são resultados diretos da herança de genes relacionados ao câncer, mas grande parte envolve danos ao material genético de origem física, química ou biológica, que se acumulam ao longo da vida (INUMARU, SILVEIRA e NAVES, 2011).

No Brasil, para o biênio 2016-2017, a estimativa é de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de neoplasias. O perfil epidemiológico observado indica que os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens são próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) estão entre os principais (BRASIL, 2015). Diante disso, as neoplasias malignas são consideradas como um problema de saúde pública não só no país, mas em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento.

Até o momento, a prevenção e a identificação precoce continuam sendo as formas mais eficazes de se evitar todos os malefícios que acompanham uma neoplasia (BRASIL, 2011). Sabe-se que a chance de cura é variável de acordo com o tipo de tumor e outras condições do indivíduo e, muitas vezes, os tratamentos

disponíveis não são eficazes, além de pouco tolerados devido a manifestação de inúmeros efeitos adversos (METRI *et al.*, 2013).

### 3.1.1 Imunologia do tumor

O sistema imunológico exerce grande influência nas neoplasias, seja impedindo ou favorecendo o surgimento destas doenças. De maneira geral, o sistema imune tem o maior potencial para a destruição específica de tumores com nenhuma toxicidade para o tecido normal permitindo ainda, a formação de memória a longo prazo que pode prevenir a recorrência de neoplasias (FINN, 2012).

Contudo, quando o sistema imune está debilitado ou com um defeito funcional, a célula cancerosa tem a capacidade de burlar esse mecanismo de defesa. Além disso, a célula maligna precisa, durante algum tempo, que o sistema imune não lhe reconheça como tal, o que é possível devido a mecanismos de escape e/ou "mascaramento", com os quais o tumor consegue evadir-se da resposta imunológica (ORTEGA *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2010). Estas evidências fizeram com que, nos últimos anos, os cientistas mudassem o foco de suas investigações da célula cancerosa para o hospedeiro e o microambiente em que cresce o tumor (FINN, 2012).

Assim, para que o organismo apresente uma resposta imune contra o tumor é necessário que as células imunocompetentes interajam com estruturas reconhecidas como não-próprias presentes nas células tumorais que, por sua vez, podem expressar antígenos com maior ou menor capacidade imunogênica. Tais antígenos podem ser basicamente de dois tipos: tumor-específicos únicos – manifestados apenas em células tumorais - e tumor associados – manifestados também em algumas células normais, porém com características quantitativas e qualitativas distintas (ALMEIDA *et al.*, 2007).

A imunogenicidade dos tumores também é afetada pela falta de peptídeos de moléculas “estranhas” que possam ser apresentadas pelas proteínas do MHC, parecendo assim, normais ao sistema imune. Há também a possibilidade de perda de uma ou mais moléculas do MHC I e a falta de expressão de proteínas coestimuladoras, necessárias para ativar os linfócitos T virgens (MURPHY, 2014).

De um modo geral, a imunidade celular destaca-se na resposta anti-tumoral. Neste contexto, as células T *helper* e citotóxicas são as mais importantes, pois

participam da destruição direta das células cancerosas e também na ativação de outros mecanismos efetores (HUNG *et al.*, 1998; WANG, 2001; MURPHY e GRIFFITH, 2016). Os linfócitos T<sub>H1</sub> contribuem na resposta global por meio da produção de citocinas. Apesar de tais células não serem ativadas pelo MHCI, sua atividade é desencadeada por células cancerosas e/ou parte delas que são fagocitadas e apresentadas via MHCII por APCs. Já os linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) são capazes de lisar diretamente as células tumorais através da produção e secreção de granzimas e perforinas (CRUVINEL *et al.*, 2010; MURPHY e GRIFFITH, 2016).

Embora de suma importância para a destruição do tumor, linfócitos T citotóxicos atuam de modo MHCI restrito, contudo alguns tumores são capazes de diminuir a expressão de antígenos associados a este MHC, conseguindo assim um meio de escapar da ação destes linfócitos. Entretanto, nestes casos, as células NK, pertencentes à imunidade inata e cuja ação não se restringe à presença de MHC, se mostram de fundamental importância (BROEK *et al.*, 1995). Ao haver interação célula-efetora:célula-alvo, e prevalecendo os sinais de ativação, em poucos minutos, observa-se a formação de uma sinapse imunológica estável entre as membranas celulares da célula NK e célula tumoral. Nessa sinapse, a célula NK libera seus grânulos citoplasmáticos (HAZELDINE *et al.*, 2012). Dentre os componentes presentes nestes grânulos, destacam-se os membros da família das granzimas, granzimosas e perforinas. As granzimas são serina-proteases altamente específicas que no meio ácido dos grânulos se mantêm inativas. Os tipos A e B são os mais abundantes e parecem ser os principais responsáveis pela destruição do alvo, sendo a granzima B, responsável por induzir apoptose por meio da ativação da via das caspases, principalmente. Já as granzimosas parecem ter sua ação preferencialmente dirigida à destruição de micro-organismos, enquanto as perforinas são capazes de formar poros na membrana plasmática por onde penetram outros componentes presentes nos grânulos da célula efetora (BROEK *et al.*, 1995; ORANGE, 2008).

Células NK podem também expressar receptores como FasL (CD95) e TRAIL (do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), que induzem a apoptose da célula alvo através da ativação de DNases (ZAMAI *et al.*, 1998). Além da indução de morte celular programada, podem destruir o alvo por indução de lise osmótica, provocando perda de material intracelular e entrada de água através dos poros formados (ARANCIA, MALORNI e DONELLI, 1990).

De acordo com Smith *et al.* (2002), as células NK podem também influenciar o desenvolvimento de LT e LB, além de participarem da formação de respostas imunológicas adaptativas (imunidade específica e memória imunológica contra tumores e patógenos). A lise de células cancerosas por células NK fornece antígenos tumorais para CDs, induzindo seu amadurecimento, tornando-se uma APC que, por sua vez ativa os LT CD8<sup>+</sup>, nos gânglios linfáticos. Além disso, o IFN- $\gamma$ , produzido por células NK ativadas, ativa LTC e células T *helper*, levando à proliferação destas células e a produção de mais citocinas. Anticorpos anti-tumorais podem ser produzidos por células B estimuladas por citocinas oriundas de células NK e de linfócitos T *helper*.

Diante do exposto, observa-se que a grande especificidade do sistema imune em conseguir destruir células cancerosas com preservação de células saudáveis seria o mecanismo ideal para o tratamento de câncer, haja vista que não haveria os efeitos adversos associados aos tratamentos disponíveis na atualidade.

### 3.1.1.1 Microambiente tumoral

Mesmo diante do papel de vigilância do sistema imunológico, o tumor tem a capacidade de manipular a resposta imune de modo a beneficiar o ao seu crescimento e à sua sobrevivência. Isso ocorre porque o processo inflamatório ativa células que podem criar um ambiente favorável para células cancerosas onde há a liberação de fatores de crescimento, indução de angiogênese e remodelagem de matriz extracelular contribuindo, inclusive, com o aparecimento de metástase (COUSSENS e WERB, 2002). Denomina-se “imuno-edição” todas as alterações causadas pelo sistema imune e que influenciam nos tumores, direta ou indiretamente (DUNN, OLD e SCHREIBER, 2004).

Os macrófagos associados a tumores (MAT), por exemplo, embora primariamente devam atuar eliminando as células tumorais quando ativados por IFNs ou interleucinas (IL-2 e IL-12), também são estimulados à produzir fatores de crescimento, angiogênicos, linfogênicos, citocinas e proteases capazes de potencializar a progressão tumoral. Além disso, produzem IL-10, uma citocina imunossupressora, que diminui a destruição das células neoplásicas mediada por células T (DUNN *et al.*, 2002; DUNN *et al.*, 2006; BOAS *et al.*, 2013).

Pikarsky *et al.* (2004) demonstrou em modelo murino de carcinoma hepatocelular que o NF- $\kappa$ B, importante no processo inflamatório, apresenta-se ativado nos hepatócitos devido a inflamação observada por meio da liberação de TNF- $\alpha$ . Deste modo, produz-se um efeito anti-apoptótico que pode ter relação aos mecanismo de progressão tumoral associada à inflamação crônica.

As CDs também são encontradas no microambiente tumoral. Dependendo de seu grau de maturidade, as CDs atuam como excelentes células fagocíticas (células imaturas) ou como APCs profissionais. Outros fatores importantes são o tipo e o modo com que são ativadas, pois as CDs são capazes de apresentar antígenos exógenos tumorais solúveis para linfócitos T virgens, tanto via MHCI, quanto MHCII (SCHNURR *et al.*, 2005). Assim, estas células desempenham importante função para a geração de uma resposta antitumoral (CUTLER, JOTWANI e PULENDRAN, 2001).

No contexto do microambiente tumoral, tem sido sugerido que a infiltração de células do sistema imune adquirido está associado a tumores de melhor prognóstico, já que espera-se uma resposta antitumoral por parte do organismo. No entanto, a presença de células do sistema imune inato, com destaque para os macrófagos, constituiria um fator favorável à progressão neoplásica, caracterizando tumores de prognóstico ruim (CACCIATORE *et al.*, 2012; SANCHEZ-ESPIRIDION *et al.*, 2012).

Além de células, há também a forte influência das citocinas como o fator de crescimento e transformação (TGF) beta, IL-10, IL-4 e IL-5, que exercem atividade imunossupressora. Outro fator capaz de afetar as células tumorais é a alta taxa de metabolismo anaeróbico de glicose que faz com que este microambiente apresente um pH ácido e rico em lactato, contribuindo para a seleção de células mais resistentes e invasivas (ESTRELLA *et al.*, 2013; JUSTUS, DONG e YANG, 2013).

### **3.1.2 Tratamentos disponíveis para o câncer**

O tratamento do câncer em geral precisa ser realizado por uma equipe multidisciplinar a fim de oferecer suporte nas diferentes esferas que são afetadas com a doença – física, psíquica e social (CANTINELLI *et al.*, 2006).

Para a erradicação do tumor, basicamente, podem ser identificadas quatro abordagens principais: cirúrgica e radioterápica, como tratamentos locais; quimioterápica e terapia com agentes biológicos (como hormônios, anticorpos ou

fatores de crescimento), como forma de tratamentos sistêmicos (ANJOS e ZAGO, 2006). Na maioria dos casos, são feitas combinações entre as quatro abordagens mencionadas, proporcionando um aumento na sobrevivência da paciente (ALMEIDA *et al.*, 2005; LEIGHL *et al.*, 2008; FRASCI *et al.*, 2010).

A técnica cirúrgica apresenta grande validade para a remoção de tumores que não metastizaram (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 2011). Já a radioterapia, na maior parte dos casos, é associada com a cirurgia agindo de modo sinérgico, uma vez que, isoladamente, não é capaz de reduzir os tumores grandes e a chance de metástase, apresentando ainda efeitos colaterais graves (YANG e HO, 2013).

A quimioterapia consiste no uso de fármacos citotóxicos, por via oral ou intravenosa, com o intuito de erradicar ou mesmo diminuir a massa tumoral na fase inicial ou avançada da doença. Em geral, é utilizada uma combinação de fármacos com mecanismos de ação distintos que permitem aumentar a eficiência do tratamento, diminuir sua toxicidade e reduzir a possibilidade de resistência (HASSAN *et al.*, 2010).

Algumas das principais classes de antineoplásicos citostáticos são fármacos que atuam: no DNA, como as antraciclinas (ex. doxorrubicina) e as mostardas nitrogenadas (melfalano); na organização do fuso mitótico (ex. vimblastina); na inibição do ciclo celular, como os taxanos (ex. paclitaxel e docetaxel); ou no citoesqueleto (ex. miltefosina). A quimioterapia é chamada de neoadjuvante ou adjuvante, dependendo se for administrada antes da remoção cirúrgica do tumor ou depois, respectivamente (HASSAN *et al.*, 2010).

Já a hormonioterapia tem impacto positivo em pacientes portadoras de tumores com receptor hormonal positivo, com ou sem utilização de quimioterapia, além de diminuir o risco de reincidivas após a remoção cirúrgica de alguns tumores, como os de mama (WOLMARK e DUNN, 2001). O principal fármaco utilizado neste grupo é o tamoxifeno, pertencente a classe dos antagonistas de receptores de estrogênio (CUZICK *et al.*, 2015).

Contudo, a ausência de seletividade destes medicamentos faz com que os mesmos sejam citotóxicos para células saudáveis, sobretudo para células de crescimento rápido como células gastrintestinais, capilares e do sistema imunológico. Por conta deste problema, ocorrem os principais efeitos adversos relacionados ao uso de quimioterapia antineoplásica (METRI *et al.*, 2013). No quadro 2, estão listados os

principais efeitos adversos gerais associados aos quimioterápicos antitumorais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

**Quadro 3:** Principais efeitos adversos relacionados a quimioterapia do câncer.

PRINCIPAIS EFEITOS ADVERSOS DA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL	
Perda de cabelos e pelos	Baixa contagem de plaquetas
Mudanças nas unhas	Fadiga
Perda ou aumento de apetite	Neuropatias
Náuseas e vômitos	Alterações no ciclo menstrual
Baixa contagem de células sanguíneas	Cardiomiopatias
Maior risco de infecções	Síndrome mão-pé
Diminuição da função cognitiva	Risco aumentado de leucemia

FONTE: Adaptado de American Cancer Society (2015).

A escolha da melhor terapêutica deve ser feita com base nas características do indivíduo, levando-se em consideração sua idade, tipo de câncer, estágio da doença e se o tumor apresenta receptores para hormônios ou não, dentre outros fatores (FRASCI *et al.*, 2010). Embora a melhor escolha seja feita para um determinado paciente, é altamente provável que surjam complicações inerentes ao tratamento antineoplásico e, por isso, o monitoramento da resposta apresentada pelo paciente é um elemento-chave na gestão do câncer, já que nem todos os indivíduos se adequam a terapia (GRAHAM *et al.*, 2014).

Devido aos efeitos colaterais e reações adversas da quimioterapia é comum observar a recusa do paciente em continuar seu tratamento, podendo comprometer a eficácia da terapia. Este é um ponto que tem sido trabalhando na área da Oncologia, pois não se pode desejar apenas aumentar o tempo de sobrevivência do indivíduo, sem

que o mesmo tenha qualidade de vida, minimizando-se o sofrimento de todos os envolvidos no processo de cuidar (SAWADA *et al.*, 2008).

O surgimento de drogas biológicas baseadas no desenvolvimento de anticorpos monoclonais (AcM) contra células tumorais trouxeram benefícios para o tratamento de alguns tipos de neoplasias. Dentre eles, destacam-se o Rituximab, já utilizado no tratamento de linfomas, e o Cetuximab e Panitumumab, utilizados em câncer colorretal. No entanto, como ocorre com qualquer classe de fármacos, a possibilidade de efeitos indesejáveis advindos do uso dos medicamentos imunobiológicos deve ser considerada. Este aspecto ganha dimensão ainda maior, dada a intensa ação dessas drogas sobre os processos imunológicos. Acrescenta-se a isso o fato de que vários dos alvos dessas moléculas participam de múltiplos processos fisiológicos, ampliando o risco de efeitos indesejáveis dos medicamentos em questão (VIEIRA e SENA, 2009). Neste contexto, drogas que atuem como antagonistas da molécula PD-1, resultando em morte da célula tumoral pelas células imunológicas são as que têm despontado como apostas de formas mais eficazes e modernas de se tratar o câncer (SUI *et al.*, 2015).

Mesmo com os avanços no tratamento, com o diagnóstico precoce e auxílio de terapias adjuvantes, uma considerável parcela de indivíduos diagnosticados com câncer desenvolvem metástase que se torna praticamente incurável e com sobrevida média de dois anos (MITCHELL *et al.*, 2006). Esta é outra evidência que fortalece os esforços da ciência na busca por novas formas de tratamento eficazes contra as neoplasias.

### **3.1.3 Ação antitumoral do resveratrol**

Em relação ao câncer, os primeiros relatos da ação do resveratrol contra esta enfermidade ocorreram em 1997, quando Jang e colaboradores (1997) publicaram um trabalho reportando a habilidade do resveratrol em inibir a carcinogênese em múltiplos estágios. No estudo mencionado, houve uma significativa redução no número de tumores de pele (98%) em camundongos tratados topicamente com resveratrol.

Desde então, diversas investigações têm demonstrado a ação deste composto sob inúmeros tipos de câncer em diferentes estágios de desenvolvimento:

*in vitro*, o resveratrol foi capaz de induzir morte celular em modelos de neuroblastoma humano (VAN GINKEL *et al.*, 2007); de câncer colorretal (TRINCHERI *et al.*, 2007) e de mama (NAKAGAWA *et al.*, 2001; LE CORRE *et al.*, 2005; TANG *et al.*, 2008), inibiu a proliferação de células malignas quimiorresistentes ou quimiossensíveis em modelos de mieloma múltiplo humano (SUN *et al.*, 2006), inibiu a proliferação celular e aumentou a apoptose em modelos de câncer de próstata (BENITEZ *et al.*, 2007), além de ocasionar uma sensível redução na migração e invasão de células de câncer mamário humano (TANG *et al.*, 2008). Outra ação atribuída ao composto foi a de potencializar a atividade anti-tumoral de fármacos como o melfalano e o tamoxifeno, ambos utilizados no tratamento do câncer de mama (CASANOVA *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2013).

Muitos mecanismos de ação têm sido postulados a fim de explicar a atividade antiproliferativa do resveratrol. Estes incluem a ativação da via apoptótica intrínseca, a geração de EROs, a modulação da via p53 e a ativação da via receptor de morte extrínseca. Especificamente, o resveratrol é capaz de interferir com a cadeia respiratória mitocondrial, gerando um aumento da produção de EROs. O estado redox das células desempenha um papel importante em muitos tipos de apoptose e a ROS produzido ao nível das mitocôndrias pode estar envolvido na morte de células (FRAZZI e TIGANO, 2014).

Em estudos *in vivo*, o resveratrol foi capaz de reduzir em mais de 40% o número de metástases em modelos de carcinoma de pulmão (KMA, 2013). Utilizando o modelo de câncer pancreático, Zhou *et al.* (2011) demonstraram que o resveratrol ativa a caspase-3, um mediador crucial de apoptose. Soma-se ainda à atividade antineoplásica *in vivo* do resveratrol, a capacidade de inibição do crescimento tumoral em modelos murinos de neuroblastoma (VAN GINKEL *et al.*, 2007), significativa redução do crescimento de adenocarcinomas mamários (BENITEZ *et al.*, 2007) e maior sensibilização de alguns tipos de células cancerosas à radioterapia (KMA, 2013).

Semelhante ao que ocorre na doença inflamatória, os mecanismos responsáveis pelas atividades antitumorais exibidas pelo resveratrol ainda não foram completamente elucidados. Apesar disso, diversos trabalhos indicam as ações do resveratrol que poderiam contribuir para este efeito. Para Fulda e colaboradores (2010), o composto atua modulando as vias de sinalização responsáveis pelos mecanismos de resistência à apoptose. Já Sautter e colaboradores (2005)

demonstraram que a inibição do crescimento tumoral pode ser resultado da inibição da cascata do ácido araquidônico, rota metabólica que pode induzir a gênese de tumores. Outra via proposta é a inibição da proteína quinase-C, um mediador chave na formação dos tumores (FULDA, 2010). A inibição da angiogênese também é apontada como um mecanismo importante do resveratrol na contenção de massas tumorais (BAUR e SINCLAIR, 2006).

Apesar de todas estas atividades, o mecanismo de ação contra o câncer mais evidente é sua habilidade em induzir apoptose nas células tumorais utilizando diferentes vias relacionadas à regulação da sobrevivência ou morte celular (STEWART, CHRISTMAN e O'BRIAN, 2000; SAUTTER *et al.*, 2005; ABDEL-MOHSEN *et al.*, 2006; TRINCHERI *et al.*, 2007; BHARDWAJ, SETHI e VADHAN-RAJ, 2007).



## 3.2 OBJETIVOS

### 3.2.1 Geral

Avaliar o potencial antitumoral de compostos análogos do resveratrol.

### 3.2.2 Específicos

#### - Análises *in vitro*

- Selecionar os análogos mais promissores por meio da análise da viabilidade de células tumorais 4T1.
- Avaliar os efeitos dos análogos sobre a viabilidade de linhagens de carcinoma mamário humano (MCF-7) e melanoma murino (B16.F1).
- Determinar a  $LC_{50}$  e o índice de seletividade dos análogos sobre as linhagens tumorais 4T1, B16.F1 e MCF-7.

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Preparo dos análogos e do resveratrol

As substâncias foram dissolvidas em uma solução de etanol P.A. (VETEC) e, em seguida, em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI-1640) (GIBCO) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico contendo penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO), de modo que a concentração final máxima de etanol utilizada nos ensaios foi de 0,1%.

#### 3.3.2 Avaliação do potencial antitumoral induzido pelos análogos do resveratrol

A atividade antineoplásica dos análogos do resveratrol também foi avaliada pelo método MTT, utilizando-se culturas de células 4T1, B16.F1 e MCF-7.

Este ensaio foi idêntico ao descrito em “Influência dos análogos do resveratrol na viabilidade de células RAW 264.7 e J774.A1” (item 2.3.4), havendo também os controles não tratados (apenas meio de cultura) e controle do etanol 0,1% (v/v). Para o ensaio com 4T1, utilizou-se uma concentração de  $2 \times 10^3$  células por poço (LAI *et al.*, 2012); para B16.F1,  $10^4$  células por poço; e para MCF-7,  $10^4$  células por poço (adaptado de POZO-GUISADO *et al.*, 2002). Em ambos os casos, submeteu-se o sistema a 48h de incubação à 37°C e sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.3.3 LC<sub>50</sub> dos análogos do resveratrol para RAW 264.7, 4T1, B16.F1 e MCF-7 e índice de seletividade

Para fins de cálculo de LC<sub>50</sub>, foram realizados os ensaios de maneira idêntica a descrita em “LC<sub>50</sub> dos análogos do resveratrol para RAW 264.7” (item 2.3.6) para as seguintes linhagens 4T1, B16.F1 e MCF-7. Após serem semeadas e aderirem à placa, as células foram expostas a 8 concentrações distintas de cada substância em teste (1000, 800, 400, 200, 100, 50, 25 e 10 µM) por 48h, quando foi aferida a taxa de viabilidade celular pelo método de MTT. Os dados foram tratados no *software* GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software Inc., EUA).

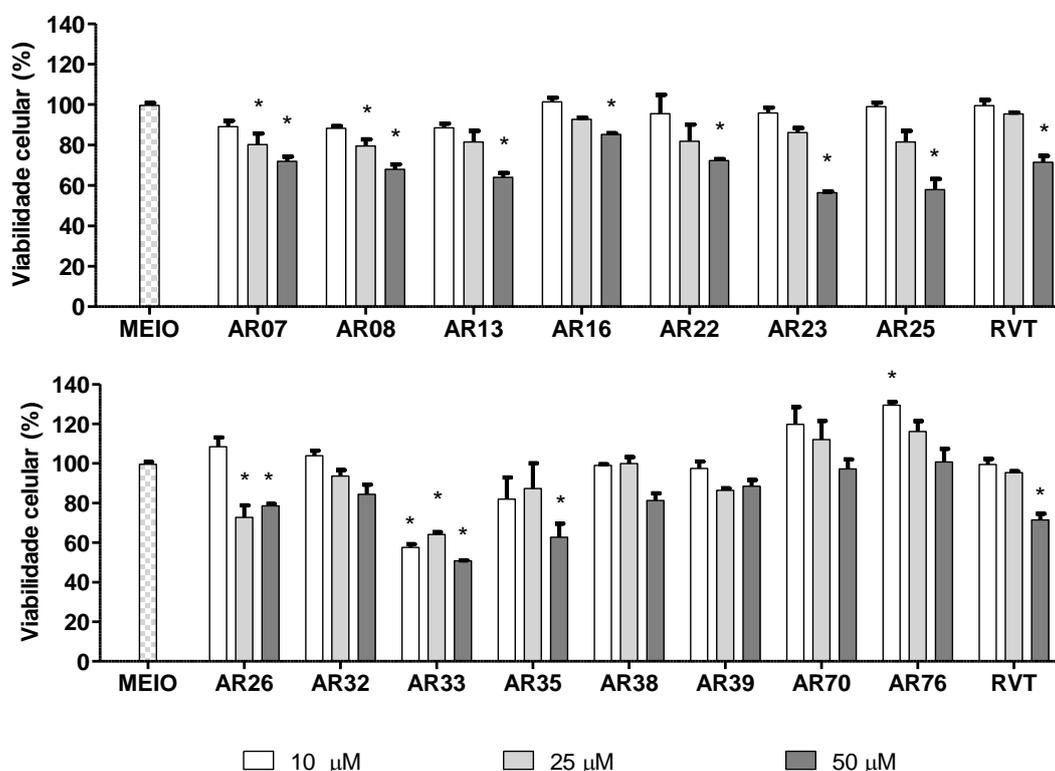
O índice de seletividade (IS) dos compostos foi calculado pela razão entre a  $LC_{50}$  obtida em cultura de células não tumorais e a  $LC_{50}$  obtida pela exposição de uma linhagem tumoral às substâncias (THOMAS *et al.*, 2014). Para a avaliação do índice de seletividade (IS) em células tumorais foi estabelecido que o mesmo não deveria ser inferior a 2, corroborando o estudo de Koch *et al.* (2005) Badisa *et al.* (2009)

### 3.3.3.1 Comparação entre a influência dos análogos do resveratrol e melfalano na viabilidade de células RAW 264.7 e macrófagos peritoneais

Foram conduzidos ainda, dois ensaios adicionais idênticos ao descrito com células RAW 264.7 (item 2.3.4) e macrófagos peritoneais (item 2.3.5) comparando-se a influência dos análogos com o melfalano no que diz respeito à viabilidade destas células. O melfalano é um agente quimioterápico amplamente usado na terapia do câncer, especialmente no mieloma múltiplo e de mama, que apresenta inúmeras reações adversas (CASANOVA *et al.*, 2012). O medicamento Alkeran®, contendo o ativo na concentração de 5mg/mL, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Angelo Atalla, chefe do serviço de hematologia do Hospital Universitário da UFJF. Preparou-se uma solução do fármaco em meio RPMI-1640 suplementado que produziu uma concentração de 10 $\mu$ M por poço.

### 3.4 RESULTADOS

Uma vez determinado o perfil citotóxico dos análogos em células RAW 264.7, também foi avaliado o potencial destes compostos sobre a viabilidade de células tumorais da linhagem 4T1, nas mesmas concentrações testadas anteriormente. Conforme demonstrado na figura 25, os análogos AR32, AR38, AR70 e AR76 não foram capazes de diminuir a viabilidade celular e/ou reduzir a proliferação das células tumorais, sendo o AR76 (50 $\mu$ M) capaz de aumentar a proliferação desta linhagem. O etanol (0,1%), mais uma vez, não influenciou significativa na viabilidade destas células tumorais.

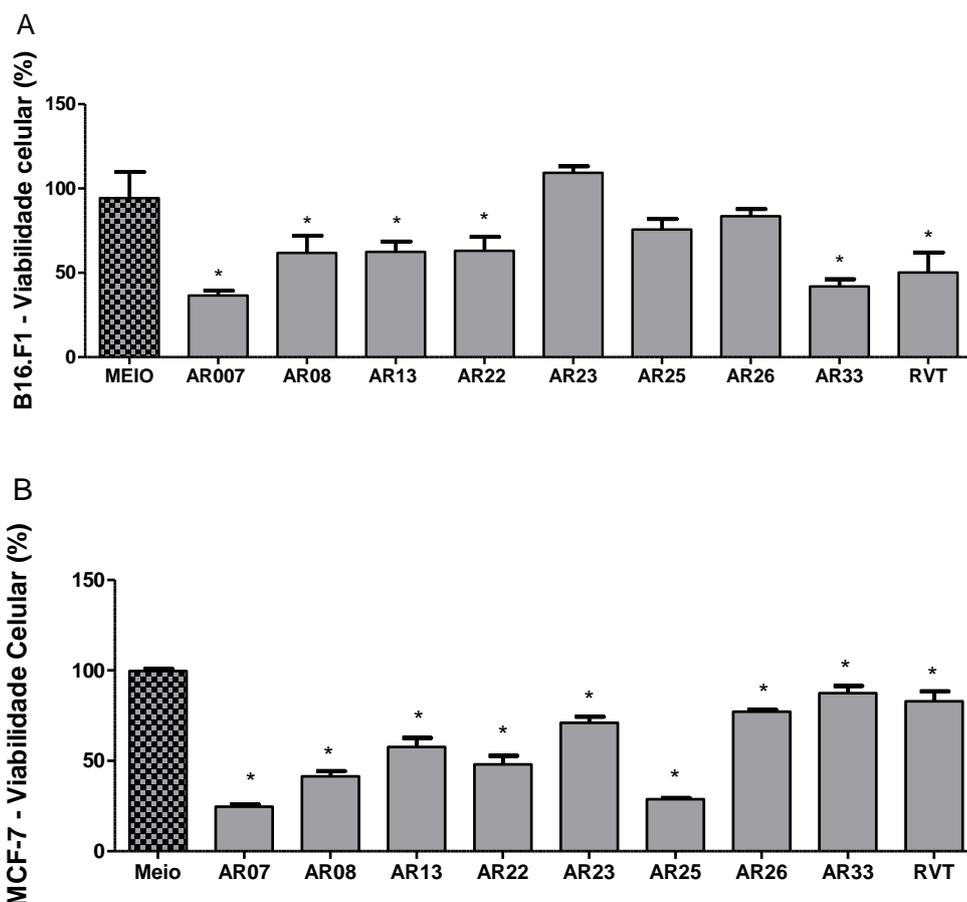


**Figura 25: Avaliação do potencial antitumoral do resveratrol e análogos sobre células 4T1 em diferentes concentrações.** Células 4T1 foram plaqueadas na concentração de  $10^4$  células por poço e expostas às concentrações de 10, 25 e 50  $\mu$ M dos análogos ou do resveratrol. Após um período de 48h de incubação, foi feita a avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT. O resultado foi expresso em percentual de sobrevivência celular calculado comparativamente ao controle (meio). O etanol 0,1% (não demonstrado na figura) não induziu diminuição da viabilidade. \* $p < 0,01$  (ANOVA/Dunnet). RVT: resveratrol.

Assim, uma vez que os compostos AR16, AR32, AR35, AR38, AR39, AR70 e AR76 apresentaram importante influência na viabilidade de células RAW264.7 e/ou baixa atividade antitumoral, estes compostos foram excluídos dos ensaios posteriores. Dentre os compostos eleitos para as análises seguintes encontram-se sete iminas (AR07, AR08, AR13, AR22, AR23, AR25, AR26) e uma hidrazona (AR33).

No âmbito da investigação de novas drogas antitumorais, um elemento-chave que deve ser avaliado logo no estágio inicial, uma vez que ajuda a impulsionar os esforços para a melhoria do projeto da droga por meio da Química Farmacêutica, é a ação dos compostos sintetizados em células tumorais *in vitro*. Neste ensaio, um dos parâmetros mais frequentemente avaliados é o impacto de uma dada molécula sobre a proliferação de uma linhagem tumoral, que pode ser medido por ensaios de viabilidade (ex. MTT) e expresso como LC<sub>50</sub> (GRIFFITHS e SUNDARAM, 2011).

Assim, para se determinar a influência dos análogos do resveratrol no crescimento/viabilidade de linhagens tumorais *in vitro*, células MCF-7 (carcinoma mamário humano) e B16.F1 (melanoma murino) foram cultivadas e expostas a 50µM dos análogos a fim de verificar se, na concentração estabelecida como a máxima de trabalho, haveria redução na viabilidade destas linhagens. O efeito dos compostos sobre as células tumorais B16.F1 e MCF-7 pode ser visto nas figuras 26A e 26B, respectivamente.



**Figura 26: Influência dos análogos do resveratrol em células tumorais de linhagens tumorais:** (A) B16.F1 e (B) MCF-7. Células B16.F1 e MCF-7 (ambas na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço) foram plaqueadas e incubadas *overnight*, quando então foram expostas a concentração de  $50 \mu\text{M}$  dos análogos ou do resveratrol por 48h. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT e calculada com relação ao meio (células não tratadas). O etanol, usado como solvente na concentração de 0,1% não afetou a viabilidade das células (dado não demonstrado). \*significa diferença em relação ao meio. (One-way ANOVA/Dunnet,  $p < 0,01$ ).

Sobre a linhagem B16.F1, observou-se que os análogos AR07, AR08, AR13, AR22 e AR33 reduziram a viabilidade em relação ao controle (meio) para 37%, 62%, 62%, 63% e 42% respectivamente. Os análogos AR23, AR25 e AR26 não demonstraram influência nesta linhagem celular na concentração de  $50 \mu\text{M}$ . Já o resveratrol, que também forneceu resultado significativo neste quesito, reduziu a viabilidade destas células para cerca de 50%.

Em relação as células MCF-7, de forma semelhante ao ocorrido com a linhagem 4T1 (carcinoma mamário murino), todos os compostos testados foram efetivos em reduzir significativamente sua viabilidade em relação ao controle.

Uma vez determinada a ação dos análogos sobre as linhagens tumorais B16.F1, 4T1 e MCF-7, tais linhagens foram expostas a uma ampla faixa de concentração dos compostos a fim de se determinar a LC<sub>50</sub> de cada análogo e o índice de seletividade, demonstrados na tabela 7.

**Tabela 7:** Valores de LC<sub>50</sub> para o resveratrol e análogos frente às linhagens tumorais B16.F1, 4T1 e MCF-7 e linhagem não tumoral RAW 264.7 e índice de seletividade (IS) dos compostos.

Composto	LC <sub>50</sub> B16.F1 ( $\mu$ M)	LC <sub>50</sub> 4T1 ( $\mu$ M)	LC <sub>50</sub> MCF-7 ( $\mu$ M)	LC <sub>50</sub> RAW 264.7 ( $\mu$ M)	IS B16.F1	IS 4T1	IS MCF-7
AR07	21,89	4,63	22,09	87,42	3,99	18,88	3,96
AR08	115,76	5,67	11,96	118,2	1,02	20,85	9,88
AR13	131,43	187,65	135,6	83,47	0,63	0,44	0,61
AR22	129,30	46,92	15,4	229,4	1,77	4,89	14,90
AR23	NR	12,79	24,87	54,4	-	4,25	2,19
AR25	NR	191,34	141,30	242,1	-	1,27	1,71
AR26	NR	64,33	372,30	398,5	-	6,19	1,07
AR33	26,54	52,52	77,66	53,9	0,49	0,97	1,44
RVT	117,43	17,23	441,40	89,62	0,76	5,20	0,20

RVT: Resveratrol. NR: Não reduz a viabilidade.

O IS é a razão entre a toxicidade do composto em células tumorais e a toxicidade do composto para células não-tumorais. Sendo assim, quanto maior for este índice, mais seletiva a droga pode ser considerada, embora valores iguais ou superiores a 2 já indiquem que uma droga possa ter considerado seu uso como antitumoral (BADISA *et al.*, 2009). Diante do exposto, os resultados referentes ao IS revelaram que, com relação às células B16, apenas o composto AR07 forneceu resultado satisfatório, enquanto com 4T1, os análogos AR07, AR08, AR22, AR23 e AR26 foram considerados seletivos. Frente às células da linhagem MCF-7, sobressaíram os análogos AR07, AR08, AR22 e AR23. Por fim, tratando-se do resveratrol, o mesmo apresentou IS superior a 2 somente para a linhagem 4T1. A

diferença percebida entre os análogos deve se relacionar às mudanças moleculares de cada um e também à sensibilidade de cada linhagem empregada.

A título de comparação, foi realizado um ensaio utilizando a droga comercial melfalano, um dos fármacos de referência no tratamento do câncer de mama (CASANOVA *et al.*, 2012). Em concentração 5 vezes menor do que a empregada para os análogos, o melfalano reduziu a viabilidade de células RAW 264.7 para  $18,65 \pm 5,13\%$  e em macrófagos peritoneais, para  $7,97 \pm 0,34\%$ , enquanto os análogos ( $50\mu\text{M}$ ) não afetaram de modo significativo a viabilidade destas células (ANOVA/Dunnet,  $p < 0,01$ ).

### 3.5 DISCUSSAO

O aumento da ocorrência de tumores e os efeitos colaterais graves de agentes quimioterápicos reduzem a eficácia clínica de uma grande variedade de agentes anticancerígenos que estão atualmente sendo utilizados. Assim, há sempre uma necessidade constante de desenvolver medicamentos anticancerígenos alternativos ou sinérgicos com efeitos colaterais mínimos. Uma estratégia importante para desenvolver novos agentes antitumorais eficazes é estudar aqueles derivados de fontes naturais. As drogas disponíveis para o tratamento do câncer oriundos das plantas e seus derivados demonstraram ser eficazes para a sua prevenção e terapêutica. O alcalóide de Vinca e seus derivados, isolados e em combinação com agentes terapêuticos, têm sido usados há muito tempo para o tratamento de vários tipos de câncer. Sem dúvidas, os polifenóis formam uma das classes mais importantes e extensivamente utilizadas de terapias derivadas de plantas para a prevenção ou quimioterapia do câncer (ALI et al., 2012).

Assim sendo, o resveratrol é um polifenol que vem apresentando atividade frente a diversas linhagens tumorais, sendo útil como um protótipo devido ao seu problema de biodisponibilidade. De modo geral, dos análogos avaliados neste estudo, as iminas foram selecionadas como os compostos mais promissores nos testes antitumorais realizados.

Foi testada a atividade antitumoral dos análogos frente a linhagens 4T1, B16.F1 e MCF-7. Estes ensaios visaram determinar a citotoxicidade direta dos compostos sobre este painel de células tumorais evidenciando que alguns análogos são eficazes para esta finalidade. Estatisticamente, apenas os análogos AR23, AR25 e AR26 não foram capazes de reduzir a viabilidade de células B16.F1.

Sabe-se que a produção excessiva de EROs e ERNs, oriundos de fatores ambientais e/ou de células efetoras do sistema imune, pode ser nocivo para as células saudáveis caso o sistema antioxidante celular não seja capaz de restaurar eficientemente os níveis normais destas espécies, gerando danos teciduais e patologias (ATASHI, MODARRESSI e PEPPER, 2015). Para Calil *et al.* (2012), compostos polifenólicos, tal como o resveratrol, têm propriedades redutoras e estruturas químicas que desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres e na quelatação de metais de transição, tanto na etapa de iniciação, como

na propagação de estresse oxidativo. Portanto, compostos capazes de inibir os radicais livres são desejáveis tanto no controle do processo inflamatório conforme já discutido, quanto para a prevenção das neoplasias.

De forma semelhante a este estudo, o efeito do resveratrol *in vitro* foi avaliado por Bove, Lincoln e Tsan (2002) sobre a viabilidade de células 4T1. Segundo os autores, o composto reduziu drasticamente o número de células viáveis (de  $48 \times 10^4$  para  $12 \times 10^4$  células), embora não tenha demonstrado a mesma efetividade no ensaio *in vivo*, problema este atribuído, em parte, a sua biodisponibilidade. Portanto, estes resultados ratificam os esforços de se encontrar novas moléculas com atividade igual ou superior ao resveratrol, porém que forneçam melhores resultados *in vivo*.

A investigação sobre a ação antitumoral do resveratrol é bastante extensa. Estudos demonstraram a inibição da proliferação de várias linhagens celulares tumorais humanas, incluindo de carcinoma epidermóide (A431) (AHMAD *et al.*, 2001) e de carcinoma mamário humano (MCF-7) (POZO-GUISADO *et al.*, 2002). Na literatura, a  $LC_{50}$  do resveratrol sobre células 4T1 foi de 13  $\mu\text{M}$ , sendo este valor próximo ao determinado no presente estudo (17,3  $\mu\text{M}$ ) apesar das diferenças adotadas em cada técnica (BOVE, LINCOLN e TSAN; 2002). Este valor foi muito próximo a  $LC_{50}$  do resveratrol frente a outras linhagens tumorais, como a humana de leucemia monocítica aguda THP-1 (TSAN *et al.*, 2000) e HL60 (RAGIONE *et al.*, 1998).

O índice de seletividade ao se investigar novas alternativas antitumorais é outro parâmetro de suma importância, pois demonstra a capacidade de a droga ser tóxica apenas para células neoplásicas. Badisa *et al.* (2009), ao analisar o IS de duas novas drogas sintéticas em células tumorais do tipo MCF-7, encontrou valores de IS iguais a 1,78 para o composto piperidinil-DES e  $>2,74$  para pirrolidinil-DES. Pela análise, os autores concluíram que estas novas drogas eram potenciais agentes antitumorais com boa toxicidade seletiva. Esta conclusão se baseou na comparação feita entre as drogas estudadas e o fármaco antitumoral tamoxifeno, que apresentou IS igual a 1,29. Embora uma comparação direta entre os resultados encontrados no estudo mencionado e os relatados neste trabalho não seja de grande exatidão, pode ser sugerido que os análogos do resveratrol (com exceção de AR08 para B16; AR13; AR25 para 4T1; e AR26 para MCF-7) apresentaram grande potencial em constituir novas drogas com potencial anti-tumoral, sendo a maioria delas de seletividade maior do que a estabelecida para o tamoxifeno em MCF-7.

Badisa *et al.* (2009) sugeriu ainda que o IS de antitumorais não deve ser inferior a 2. Sob este critério, os análogos AR08, AR13 AR22 e o resveratrol extrapolam este valor para células B16; AR13 e AR25 para células 4T1 e AR13, AR25, AR26, AR33 e resveratrol para MCF-7. Contudo, seria interessante estabelecer este valor com outras linhagens não tumorais além da RAW 264.7, tal como fibroblastos da linhagem MCF-10. Além disso, a avaliação antitumoral destas novas drogas é apenas inicial podendo ainda ser investigados mecanismos de sinergismo com drogas clássicas antitumorais a fim de permitir o uso de ambas em baixas doses ou, o que é condizente com o contexto deste trabalho, avaliar vias imunológicas que podem ajudar na erradicação do tumor. De acordo com Estrov *et al.* (2003), foi demonstrado que a citocina IL-1 $\beta$  está relacionada à proliferação de alguns tipos de células tumorais (OCIM2), como na leucemia. Portanto, compostos capazes de diminuir sua produção, como é o caso dos análogos, podem ser úteis neste sentido, além de existirem outras vias que podem contribuir neste sentido como a regulação da expressão de PD-1 e PD-1 ligante.

Por fim, conforme demonstrado, os análogos foram menos tóxicos para células RAW 264.7 e macrófagos peritoneais do que o melfalano, ao mesmo tempo que alguns deles foram capazes de reduzir a viabilidade das linhagens envolvidas neste estudo. Um dos efeitos colaterais mais comuns decorrentes do uso deste medicamento relaciona-se a leucopenia, trombocitopenia e transtornos gastrintestinais (CASANOVA *et al.*, 2012). Apesar do tamanho do baço ter sido avaliado em outra condição patológica diferente do tumor, percebeu-se que os análogos não promoveram alterações neste órgão que caracterizariam a imunossupressão, sugerindo-se que seus efeitos em indivíduos debilitados poderia ser menos agressivo do que fármacos clássicos já estabelecidos como antitumorais.

Portanto, nesta etapa inicial foi determinada a LC<sub>50</sub> de cada composto e o IS dos mesmos, podendo se inferir que os análogos AR07 e AR23 são seletivos frente as três linhagens testadas; AR08 e AR22, frente a 4T1 e MCF-7; e AR26 e AR33, frente a 4T1. Assim, uma investigação *in vivo* futura da ação dos mesmos pode esclarecer um pouco mais sobre sua eficácia e vias de ação.

### 3.6 CONCLUSÃO

Em relação ao potencial antitumoral, os compostos AR07, AR08, AR22, AR23, AR26 e AR33 forneceram resultados satisfatórios, demonstrando considerável seletividade para células tumorais.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. M. Cardioprotective effect of resveratrol analogue isorhapontigenin versus omega-3 fatty acids in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 72, n. 3, p. 469-84, 2016.
- ABDEL-MOHSEN, M.; BAYELE, H.; KUHNLE, G.; GIBSON, G.; DEBNAM, E.; SRAI, S. Distribution of [<sup>3</sup>H]trans-resveratrol in rat tissues following oral administration. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 62-70, 2006.
- ABDEL-WAHAB, B. F.; AWAD, G. E.; BADRIA, F. A. Synthesis, antimicrobial, antioxidant, anti-hemolytic and cytotoxic evaluation of new imidazole-based heterocycles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 1505-1511, 2011.
- ABEGUNDE, D. O.; MATHERS, C. D.; ORTEGON, M.; STRONG, K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. **The Lancet**, v. 370, n. 9603, p. 1929-38, 2007.
- AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 186, n.1, p. 28-37, 2003.
- AHMAD, N.; ADHAMI, V. M.; AFAQ, F.; FEYES, D. K.; MUKHTAR, H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1466-73, 2001.
- ALLEN, A. M.; GRAHAM, A. Mitochondrial function is involved in regulation of cholesterol efflux to apolipoprotein (apo)A-I from murine RAW 264.7 macrophages. **Lipids in Health and Diseases**, v. 11, p. 169, 2012.
- ALLISI, A.; CARPINO, G.; OLIVEIRA, F. L.; PANERA, N.; NOBILI, V.; GAUDIO, E. The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications. **Mediators and Inflammation**, v. 2017, article ID 8162421, 15p. 2017.
- ALLISON, A. C.; FERLUGA, J.; PRYDZ, H.; SCHORLEMMER, H. U. The role of macrophage in chronic inflammation. **Agents Actions**, v. 8, n. 1-2, p. 27-35, 1978.
- ALMEIDA, J. R. C.; PEDROSA, N. L.; LEITE, J. B.; FLEMING, T. R. P.; CARVALHO, V. H.; CARDOSO, A. A. A. Marcadores tumorais: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-16, 2007.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicas que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Survivor**. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/>. 2015. Acesso em 09 jun 2015. 123p.

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON RHEUMATOID ARTHRITIS GUIDELINES: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatoid**, v. 46, p. 328-46, 2002.

ANDERSON, G.; HORVATH, J. The growing burden of chronic disease in America. **Public Health Reports**, v. 3, p. 263-70, 2004.

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

ANJOS, L. M. J.; FONSECA, A. D. S.; GAMEIRO, J.; PAOLI, F. Low-intensity infrared laser effects on zymosan-induced articular inflammatory response. **SPIE Proceedings**, 9321, ID1117/12.2079785, 2015.

ANTUS, C.; RADNAI, B.; DOMBOVARI, P.; FONAI, F.; AVAR, P.; MATYUS, P.; RACZ, B.; SUMEGI, B.; VERES, B. Anti-inflammatory effects of a triple-bond resveratrol analog: structure and function relationship. **European Journal of Pharmacology**, v. 748, p. 61-7, 2015.

ARANCIA, G.; MALORNI, W.; DONELLI, G. Cellular mechanisms of lymphocyte-mediated lysis of tumor cells. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 26, n. 3-4, p. 369-84, 1990.

ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S.; SUZUKI, K.; KURA, F.; MAEDA, N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1828- 1836, 1999.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. 2012. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2011

ATASHI, F.; MODARRESSI, A.; PEPPER, M. S. The role of reactive species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 10, p. 1150-63, 2015.

AYUKAWA, H.; MATSUBARA, T.; KANEKO, M.; HASEGAWA, M.; ICHIYAMA, T.; FURUKAWA, S. Expression of CTLA-4 (CD152) in peripheral blood T cells of children with influenza 140urvi infection including encephalopathy in comparison with respiratory syncytial 140urvi infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 137, n. 1, p. 151-5, 2004.

AZIZ, M.; AFAQ, F.; AHMAD, N. Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in 141urviving. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 1, p. 25-31, 2004.

BABU, D.; LECLERQ, G.; GOOSSENS, V.; REMIJSEN, Q.; VANDENABEELE, P.; MOTTERLINI, R.; LEFEBVRE, R. A. Antioxidant potential of CORM-A1 and resveratrol during TNF- $\alpha$ /cycloheximide-induced oxidative stress and apoptosis in murine intestinal epithelial MODE-K cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 288, n. 2, p. 161-78, 2015.

BADISA, R. B.; REED, S. F. D.; JOSEPH, P.; COOPERWOOD, J. S.; LATINWO, L. S.; GOODMAN, C. B. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2993-6, 2009.

BAE, S. J.; HA, Y. M.; PARK, J. Y.; SONG, Y. M.; HA, T. K.; CHUN, P.; MOON, H. R.; CHUNG, H. Y. Design, synthesis, and evaluation of  $\epsilon$ -N-substituted benzylidene-aniline derivatives as tyrosinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 383-90, 2012.

BALLY, A. P. R.; LU, P.; TANG, Y.; AUSTIN, J. W.; SCHARER, C. D.; AHMED, R.; BOSS, J. M. NF- $\kappa$ B regulates PD-1 expression in macrophages. **Journal of Immunology**, v. 194, n. 9, p. 4545-54, 2015.

BARTZATT, R.; CIRILLO, S. L.; CIRILLO, J. D.; DONIGAN, L. Bifunctional constructs of aspirin and ibuprofen (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) that express antibacterial and alkylation activities. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 273-82, 2003.)

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potencial of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 493-506, 2006.

BENITEZ, D. A.; POZO-GUISADO, E.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; FERNANDEZ-SALGUERO, P. M.; CASTELLÓN, E. A. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 2, p. 282-93, 2007.

BÉRTOLO, M. B.; BRENOL, C. V.; SCHAINBERG, C. G.; NEUBARTH, F.; LIMA, F. A. C.; LAURINDO, I. M.; SILVEIRA, I. G.; PEREIRA, I. A.; LOURES, M. A. R.; AZEVEDO, M. N.; FREITAS, M. V. C.; NETO, M. S. P.; XAVIER, R. M.; GIORGI, R. D. N.; KOWALSKI, S. C.; ANTI, S. M. A. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, p. 151-9, 2007.

BHARDWAJ, A.; SETHI, G.; VADHAN-RAJ, S.; BUESO-RAMOS, C.; TAKADA, Y.; GAUR, U.; NAIR, A. S. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor- $\kappa$ B-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2293-2302, 2006.

BI, X. L.; YANG, J. Y.; DONG, Y. X.; WANG, J. M.; CUI, Y. H.; IKESHIMA, T.; ZHAO, Y. Q.; WU, C. F. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 1, p. 185-93, 2005.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2007.

BILLACK, B.; RADKAR, V.; ADIABOUAH, C. *In Vitro* evaluation of the cytotoxic and antiproliferative properties of resveratrol and several of its analogs. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 13, n. 4, p. 553-69, 2008.

BIRRELL, M. A.; MCCLUSKIE, K.; WONG, S.; DONNELLY, L. E.; BARNES, P. J.; BELVISI, M. G. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-κB-independent mechanism. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 7, p. 840-1, 2005.

BOAS, D. S. V.; TAKIYA, C. M.; GURGEL, C. A. S.; CABRAL, M. G.; SANTOS, J. N. Tumor-Infiltrating Macrophage and Microvessel Density in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 3, p. 194-199, 2013.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, n. 1, p. 17-26, 2000.

BOHM, M.; ROSENKRANZ, S.; LAUFS, U. Alcohol and red wine: impact on cardiovascular risk. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 1, p. 11-16, 2004.

BOISSIER, M. C. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. **Joint Bone Spine**, v. 78, n. 3, p. 230-34, 2011.

BOSMA-DEN BOER, M. M.; VAN WETTEN, M.; PRUIMBOOM, L. Chronic inflammatory diseases are stimulated by current lifestyle: how diet, stress levels and medication prevent our body from recovering. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, p. 1-14, 2009.

BOORA, F.; CHIRISA, E.; MUKANGANYAMA, S. Evaluation of Nitrite Radical Scavenging Properties of Selected Zimbabwean Plant Extracts and Their Phytoconstituents. **Journal of Food Processing**, v. 2014, article ID 918018, 7p. 2014.

BOUMA, G.; STROEBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521-533, 2003.

BOVE, K.; LINCOLN, D. W.; TSAN, M. F. Effect of Resveratrol on growth of 4T1 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, n. 4, p. 1001-5, 2002.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G.

Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador, 2005. 28p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 128p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122p.

BROEK, M. F.; KAGI, D.; ZINKERNAGEL, R. M.; HENGARTNER, H. Perforin dependence of natural killer cell mediated tumor control *in vivo*. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 12, p. 3514-6, 1995.

BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN, M. E.; CROZIER, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3337-40, 2002.

BURGER, D.; DAYER, J. M.; PALMER, G.; GABAY, C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? **Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 879-96, 2006.

BUTLER, D. M.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. **European Cytokine Network**, v. 6, p. 225-30, 1995.

CACCIATORE, M.; GUARNOTTA, C.; CALVARUSO, M.; SANGALETTI, S.; FLORENA, A. M.; FRANCO, V.; COLOMBO, M. P.; TRIPODO, C. Microenvironment-centred dynamics in aggressive B-cell lymphomas. **Advances in Hematology**, v. 2012, n. 2012, p. 1-12, 2012.

CALDER, P. C.; ALBERS, R.; ANTOINE, J. M.; BLUM, S.; BOURDET-SICARD, R.; FERNS, G. A.; FOLKERTS, G.; FRIEDMANN, P. S.; FROST, G. S.; GUARNER, F.; LOVIK, M.; MACFARLNAE, S.; MEYER, P. D.; RABET, L. M.; SERAFINI, M.; VAN EDEN, W.; VAN LOO, J.; VAS DIAS, W.; VDRY, S.; WINKLHOFFER-ROOB, B. M.; ZHAO, J. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 101, sup. S1, p. 1-47, 2009.

CALIL, N. O.; DE CARVALHO, G. S. G.; DA SILVA, A. F.; DA SILVA, A. D.; RAPOSO, N. R. B. Antioxidant Activity of Synthetic Resveratrol Analogs: A Structure-Activity Insight. **Letters and Drug Design and Discovery**, v. 9, n. 7, p. 676-9, 2012.

CANTINELLI, F. S.; CAMACHO, S. R.; SMALETZ, O.; GONSALES, B. K.; BRAGUITTONI, E.; RENNÓ JR., J. A oncopsiquiatria no câncer de mama: considerações a respeito de questões do feminino. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 33, n. 3, p. 124-133, 2006.

CARVALHO DE, G. S. G.; DIAS, R. M. P.; PAVAN, F. R. ; LEITE, C. Q. F. ; SILVA, V. L. ; DINIZ, C. G. ; PAULA, D. T. S. ; COIMBRA, E. S. ; RETAILLEAU, P. ; DA SILVA, A. D. Synthesis, Cytotoxicity, Antibacterial and Antileishmanial Activities of Imidazolidine and Hexahydropyrimidine Derivatives. **Medicinal Chemistry (Hilversum)**, v. 9, p. 351-59, 2013.

CASANOVA, F.; QUARTI, J.; DA COSTA, D. C.; RAMOS, C. A.; DA SILVA, J. L.; FIALHO, E. Resveratrol chemosensitizes breast 144ancer cells to melphalan by cell cycle arrest. **Journal of Cell Biochemistry**, v. 113, n. 8, p. 2586-96, 2012.

CASTINO, R.; PUCER, A.; VENERONI, R.; MORANI, F.; PERACCHIO, C.; LAH, T.T.; ISIDORO, C. Resveratrol reduces the invasive growth and promotes the acquisition of a long-lasting differentiated phenotype in human glioblastoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4264–72, 2011.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-23, 2002.

CICCHITTI, L.; MARTELLI, M.; CERRITELLI, F. Chronic inflammatory disease and osteopathy: a systematic review. **Plos One**, v. 10, n. 3, e0121337, 2015.

CHANG, M. C.; LU, W. Y.; CHANG, H. Y.; LAI, Y. C.; CHIANG, M. Y.; CHEN, H. Y.; CHEN, H. Y. Comparative Study of Aluminum Complexes Bearing N,O- and N,S-Schiff Base in Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone and L-Lactide. **Inorganic Chemistry**, v. 54, p. 23, p. 11292-11298, 2015.

CHEN, W.; GONG, Y.; ZHANG, X.; TONG, Y.; WANG, X.; FEI, C.; XU, H.; YU, Q.; YAO, W.; SHI, Y. Decreased expression of IL-27 in moderate-to-severe psoriasis and its anti-inflammation role in imiquimod-induced psoriasis-like mouse model. **Journal of Dermatological Science**, v. 85, n. 2, p. 115-23, 2017.

CHINEN, J.; BUCKLEY, R. H. Transplatation immunology: solid organ and bone marrow. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, 2 sup 2, p. s324-35, 2010.

CIANCIULLI, A.; DRAGONE, T.; CALVELLO, R.; PORRO, C.; TROTTA, T.; LOFRUMENTO, D. D. PANARO, M. A. IL-10 plays a pivotal role in anti-inflammatory effects of resveratrol in activated micrógliia cells. **International Immunology**, v. 24, n. 2, p. 369-76, 2015.

COLASANTI, M.; PERSICHINI, T. Nitric oxide: an inhibitor of NF-kappaB/Rel system in glial cells. **Brain Research Bulletin**, v. 52, p. 155-61, 2000.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397-406, 2001.

CORADINI, K.; FRIEDRICH, R. B.; FONSECA, F. N.; VENCATO, M. S.; ANDRADE, D. F.; OLIVEIRA, C. M.; BATTISTEI, A. P.; GUTERRES, S. S.; DA ROCHA, M. I.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 163-70, 2015.

COSTA, V. S. C.; FILGUEIRAS, R. T.; FIGUEIREDO, B. B. M.; MAZZOCOLI, L.; CARDOSO, S. H.; CASTANON, M. C. M. N.; AMARANTE, G. W.; ALMEIDA, M. V.; RAPOSO, N. R. B.; TEIXEIRA, H. C. High anti-inflammatory activity and low toxicity of thalidomide analogs. **Medicina Chemistry**, v. 5, p. 334-9, 2015.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, 420:860-67, 2002.

CROWSON, C. S.; MATTESON, E. L.; DAVIS, J. M.; GABRIEL, S. E. Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. **Arthritis Care Research**, v. 65, n. 1, p. 71-7, 2013.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELA, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-47, 2010.

CUTLER, C. W.; JOTWANI, R.; PULENDRAN, B. Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel? **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4703-08, 2001.

CUZICK, J.; CAWTHORN, S.; HAMED, H.; HOLLI, K.; HOWELL, A.; FORBES, J. F. Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. **Lancet Oncology**, v. 16, p. 67-76, 2015.

CUZZOCREA, S. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 27, p. 3551-7, 2004.

DAVE, M.; ATTUR, M.; PALMER, G.; AL-MUSSAWIR, H. E.; KENNISH, L.; PATEL, J. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 9, p. 2786-97, 2008.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42, n. 1-2, p.29-33, 1994.

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

- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-47, 1996.
- DIMASSI, A. I.; RAHAL, M. K.; ISKANDARANI, M. M.; BOURAAD, E. P. Is there any role for topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of mild to moderate musculoskeletal pain in a Lebanese community pharmacy? **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 1236, 2016.
- DIMITROVA, P.; IVANOVSKAA, N.; SCHWAEBLEB, W.; GYURKOVSKAA, V.; STOVER, C. 2010. The role of properdin in murine zymosan-induced arthritis. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 1458–1466.
- DONAHUE, K. E.; JONAS, D. E.; HANSEN, R. A.; ROUBEY, R.; JONAS, B.; LUX, L. J.; GARTLEHNER, G.; HARDEN, E.; WILKINS, T.; PERAVALI, V.; BAMGDIWALA, S. I.; YUEN, A.; THIEDA, P.; MORGAN, L. C.; CROTTY, K.; DESAI, R.; VAN NOORD, M. Drug Therapy for Rheumatoid Arthritis in Adults: An Update. **Comparative Effectiveness Review**, 55. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality, 2012, 191 p. Disponível em: <[www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm](http://www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm)>. Acesso em: 10 jun. 2015.
- DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, p. 991-8, 2002.
- DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 836-48, 2006.
- DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 137-48, 2004.
- DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 491. 2014.
- EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Effect of radiotherapy after breastconserving surgery on 10 year recurrence and 15 year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. **Lancet**, v. 378, n. 9804, p. 1707-16, 2011.
- ELMALI, N.; BAYSAL, O.; HARMA, A.; ESENKAYA, I.; MIZRAK, B. Effects of Resveratrol in inflammatory arthritis. **Inflammation**, v. 30, n. 1-2, p. 1-6, 2007.
- ELMALI, N.; ESENKAYA, I.; HARMA, A.; ERTEM, K.; TURKOZ, Y.; MIZRAK, B. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. **Inflammation Research**, v. 54, n. 4, p. 158-62, 2005.
- EMAMI, S.; DADASHPOUR, S. Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 611-630, 2015.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 3714-7, 2000.

ESTRELLA, V.; CHEN, T.; LLOYD, M.; WOJTKOWIAK, J.; CORNELL, H. H.; IBRAHIM, A. H.; BAILEY, K.; BALAGURUNATHAN, Y.; ROTHBERG, J. M.; SLOANE, B. F.; JOHNSON, J.; GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. **Cancer Research**, v. 73, n. 5, p. 1524-35, 2013.

ESTROV, Z.; SHISHODIA, S.; FADERL, S.; HARRIS, D.; VAN, Q.; KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol blocks interleukin-1 $\beta$ -induced activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 987-95, 2003.

FINN, O. J. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. **Annals of Oncology**, v. 23, sup. 8, p. viii6-9, 2012.

FLECKNELL P. **Laboratory animal anaesthesia**. 3<sup>rd</sup> ed. United Kingdom: Academic Press; 2009. 300 p.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-71, 2000.

FORDHAM, J. B.; NAQVI, A. R.; NARES, S. Leukocyte production of inflammatory mediators is inhibited by the antioxidants phloretin, silymarin, hesperetin, and resveratrol. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 938712, 2014.

FRASCI, G.; D'AIUTO, G.; COMELLA, P.; D'AIUTO, M.; DI BONITO, M.; RUFFOLO, P.; IODICE, G.; PETRILLO, A.; LASTORIA, S.; OLIVIERO, P.; CAPASSO, I. MONTELLA, M.; SIANI, C.; SANTANGELO, M.; VIZIOLI, L.; COMELLA, G. Preoperative weekly cisplatin, epirubicin and paclitaxel (PET) improves prognosis in locally advanced breast cancer patients: an update of the Southern Italy Cooperative Oncology Group (SICOG) randomized trial 9908. **Annals of Oncology**, v. 21, n. 4, p. 707-16, 2010.

FRAZZI, R.; TIGANO, M. The multiple mechanisms of cell death triggered by resveratrol in lymphoma and leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 4977-93, 2014.

FULDA, S. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. **Planta medica**, v. 76, n. 11, p. 1075-9, 2010.

GABAY, C.; LAMMACHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Review Rheumatology**, v. 6, p. 232-41, 2010.

GAIKWAD, D. D.; CHAPOLIKAR, A. D.; DEVKATE, C. G.; WARAD, K. D.; TAYADE, A. P.; PAWAR, R. P.; DOMB, A. J. Synthesis of indazole motifs and their medicinal

importance: an overview, **European Journal of Medicine Chemistry**, v. 90, p. 707-31, 2015.

GAO, X.H.; DEEB, D.; MEDIA, J.; DIVINE, G.; JIANG, H.; CHAPMAN, R. A.; GAUTAM, S. C. Immunomodulatory activity of resveratrol: discrepant in vitro and in vivo immunological effects. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 2427-2435, 2003.

GOMES, P. R.; MIGUEL, F. B.; OLIVEIRA, M. E.; FERREIRA, V. V.; MARTINS, D. S.; LIMA, A. B.; BARBOSA, C. S.; OLIVEIRA, M. A.; ALMEIDA, M. V.; VIANA, G. H. R.; COURI, M. R. C.; VAROTTI, F. P. Síntese e avaliação da atividade antimalárica de compostos derivados da curcumina. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 492-6, 2014.

GORDON, S.; UNKELESS, J. C.; COHN, Z. A. Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis is; evidence for a two-stage process. **Journal of Experimental Medicine**, v. 140, n. 4, p. 995-1010, 1974.

GRAFT AIKINS, A.; ADDO, J.; OFEI, F.; BOSU, W. K.; AGYEMANG, C. Ghana's burden of chronic non-communicable diseases: future directions in research, practice and policy. **Ghana Medical Journal**, v. 46, n. 2, p. 1-3, 2012.

GRAHAM, L. J.; SHUTE, M. P.; SCHEBLE, E. J.; FLYNT, F. L.; CLEMENSHAW, M. N.; KIRKPATRICK, A. D.; GALLAGHER, C.; NISSAN, A.; HENRY, L.; STOJADINOVIC, A.; PEOPLES, G. E.; SHUMWAY, N. M. Current approaches and challenges in monitoring treatment responses in breast cancer. **Journal of Cancer**, v. 5, n. 1, p. 58-68, 2014.

GRIBBEN, J. G. *et al.* CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 92, n. 3, p. 811-5, 1995.

GRIFFITHS, M.; SUNDARAM, H. Drug design and testing: profiling of antiproliferative agents for cancer therapy using a cell-based methyl-[3H]-thymidine incorporation assay. **Methods in Molecular Biology**, n. 731, p. 451-465, 2011.

GROSSMAN, J. M.; GORDON, R.; RANGANATH, V. K.; DEAL, C.; CAPLAN, L.; CHEN, W.; CURTIS, J. R.; FURST, D. E.; MCMAHON, M.; PATKAR, N. M.; VOLKMANN, E.; SAAG, K. G. American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Arthritis Care & Research**, v. 62, n. 11, p. 1515-26, 2010.

GUANTAI, E.; CHIBALE, K. How can natural products serve as a viable source of lead compounds for the development of new/novel anti-malarials? **Malaria Journal**, v. 10, suppl 1, S2, 2011.

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

GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L.; MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p. 421-425, 2008.

GUTIERREZ-GUTIERREZ, G.; Sereno, M.; Miralles, A.; Casado-Sáenz, E.; Gutiérrez-Rivas, E. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: clinical features, diagnosis, prevention and treatment strategies. **Clinical and Translational Oncology**, v. 12, n. 2, p. 81-91, 2010.

HA, Y. M.; PARK, J. Y.; PARK, Y. J.; PARK, D.; CHOI, Y. J.; KIM, J. M.; LEE, E. K.; HAN, Y. K.; KIM, J. A.; LEE, J. Y.; MOON, H. R.; CHUNG, H. Y. Synthesis and biological activity of hydroxy substituted phenyl-benzo[d]thiazole analogues for antityrosinase activity in B16.F1 cells. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 2445-9, 2011.

HADI, V.; HOTARD, M.; LING, T.; SALINAS, Y. G.; PALACIOS, G.; CONNELLY, M.; RIVAS, F. Evaluation of *Jatropha isabelli* natural products and their synthetic analogs as potential antimalarial therapeutic agents. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 65, p. 376-80, 2013.

HAFLER, D. A. Cytokines and interventional immunology. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 413, 10.1038/nri2101, 2007.

HASSAN, M. S. U.; ANSARI, J.; SPOONER, D.; HUSSAIN, S. A. Chemotherapy for breast cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 24, p. 1121-31, 2010.

HAYASHIDA, K.; NANKI, T.; GIRSCHICK, H.; YAVUZ, S.; OCCHI, T.; LIPSKY, P. E. Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. **Arthritis Research**, v. 3, n. 2, p. 118-26, 2001.

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

HOLMES-MCNARY, M.; BALDWIN, A. S. Chemopreventive properties of transresveratrol are associated with inhibition of activation of the IKK kinase. **Cancer Research**, v. 60, p. 3477-83, 2000.

HOLTHOFF, J. H.; WOODLING, K. A.; DOERGE, D. R.; BURNS, S. T.; HINSON, J. A.; MAYEUX, P. R. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1260-65, 2010.

HUNG K., HAYASHI R., LAFOND-WALKER A., LOWENSTEIN C., PARDOLL D., LEVITSKY H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 2357-2368, 1998.

HUO, M.; CUI, X.; XUE, J.; CHI, G.; GAO, R.; DENG, X.; GUAN, S.; WEI, J.; SOROMU, L. W.; FENG, H.; WANG, D. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW

264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. **Journal of Surgical Research**, v. 180, p. e47-54, 2013.

HUSHMENDY, S.; JAYAKUMAR, L.; HAHN, A. B.; BHOIWALA, D. L.; CRAWFORD, D. R. Select phytochemicals suppress human T-lymphocytes and mouse splenocytes suggesting their use in autoimmunity and transplantation. **Nutrition Research**, v. 28, n. 8, p. 568-78, 2009.

IGNATOWICZ, E.; BAER-DUBOWSKA W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 53, p. 557-69, 2001.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 6, p. 907-20, 2002.

IMLER, T.J., JR.; T.M. PETRO. Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17+IL-10+ T cells, CD4(-) IFN-gamma+ cells, and decreased macrophage IL-6 expression. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 134-43, 2009.

INTLEKOFER, A. M.; THOMPSON, C. B. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade cancer immunotherapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 1, p. 25-39, 2013.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A.; NAVES, M. M. V. Risk and protective factors for breast cancer: a systematic review. **Caderno de Saúde Pública**, v. 27, n. 7, p. 1259-1270, 2011.

ISO 10993-5:2009. **Biological evaluation of medical devices**. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization, Switzerland, 42p.

IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, 2006.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 533-47, 1995.

JANEWAY, C.A.J.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science, 2001.

JANG, K.; KIM, M. K.; OH, J.; CHO, J. Y.; YU, K. S.; CHOI, T. K.; LEE, S. H.; LIM, K. S. Effects of dexamethasone coadministered with oseltamivir on the pharmacokinetics of oseltamivir in healthy volunteers. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 705-11, 2017.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O., SLOWING, K.V. THOMAS, C.F. BEECHER, C.W. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218-20, 1997.

JEONG, M. H.; YANG, K. W.; CHOI, Y. J.; KIM, S. D.; YOO, Y. H.; SEO, S. Y.; LEE, S. H.; RYU, S. R.; LEE, C. M.; SUH, H. S.; JO, W. S. Resveratrol analog, HS1793 enhance antitumor immunity by reducing the CD4+CD25 + regulatory T cells in FM3A tumor bearing mice. **International Immunopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 326-33, 2012.

JIANG, H.; SHANG, X.; WU, H.; HUANG, G.; WANG, Y.; AL-HOLOU, S.; GAUTAM, S. C.; CHOPP, M. Combination treatment with resveratrol and sulforaphane induces apoptosis in human U251 glioma cells. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 1, p. 152-61, 2010.

JORGE, L. L.; FERES, C. C.; TELES, V. E. P. Topical preparations for pain relief: efficacy and patient adherence. **J Pain Res**, v. 4, p. 11-24, 2011.

JUSTUS, C. R.; DONG, L.; YANG, L. V. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 354, p. 1-9, 2013.

KARAMAN, N.; SICAK, Y.; TASKIN-TOK, T.; OZTURK, M.; KARAKUÇUK-IYIDOGAN, A.; DIKMEN, M.; KOÇYIGIT, K. B.; ORUÇU-EMRE, E. E. New piperidine-hydrazone derivatives: Synthesis, biological evaluations and molecular docking studies as AchE and BchE inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 270-83, 2016.

KAUR, G.; DUFOUR, J. M. Cell lines – Valuable tools or useless artifacts. **Spermatogenesis**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2012.

KHANDUJA, K. L.; BHARDWAJ, A.; KAUSHIK, G. Resveratrol inhibits *N*-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 50, n. 1, p. 61-5. 2004.

KEIR, M.E.; SHARPE, A. H. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. **Immunology Reviews**, v. 204, p. 128-43, 2005.

KEYSTONE, E. C.; SCHORLEMMER, H. U.; POPE, C.; ALLISON, A. C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis and Rheumatism**, v. 20, n. 7, p. 1396-401, 1977.

KIM, J.; JOO LEE, H., WON LEE, K. Hyperhomocysteinemia due to short-term folate deprivation is related to electron microscopic changes in the rat brain. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 11, p. 3418-21, 2002.

KMA, L. Synergistic effect of resveratrol and radiotherapy in control of cancers. **Asian Pacific Journal Cancer Prevention**, v. 14, n. 11, p. 6197-208, 2013.

KNOBLOCH, J.; WAHL, C.; FELDMANN, M.; JUNGCK, D.; STRAUCH, J.; STOELBEN, E.; KOCH, A. Resveratrol attenuates the release of inflammatory cytokines from human bronchial smooth muscle cells exposed to lipoteichoic acid in

chronic obstructive pulmonary disease. **Basic Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, n. 2, p. 202-9, 2014.

KOCH, A.; TAMEZ, P.; PEZZUTO, J.; SOEJARTO, D. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Massai of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 95–99, 2005.

KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T (H)17 cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 484-7, 2007.

KUMAR, A.; SHARMA, S. S. NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, p. 360–5, 2010.

KUSANO, K.F.; NAKAMURA, K.; KUSANO, H.; NISHII, N.; BANBA, K.; IKEDA, T.; HASHIMOTO, K.; YAMAMOTO, M.; FUJIO, H.; MIURA, A.; OHTA, K.; MORITA, H.; SAITO, H.; EMORI, T.; NAKAMURA, Y.; KUSANO, I.; OHE, T. Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. **Circulation Journal**, v. 68, n. 7, p. 671-6, 2004.

LAAR, M. V.; PERGOLIZZI JR.; J. V.; MELLINGHOFF, H. U.; MERCHANTE, I. M.; NALAMACHU, S.; O'BRIEN, J.; PERROT, S.; RAFFA, R. B. Pain treatment in Arthritis-related pain: beyond NSAIDs. **The Open Rheumatology Journal**, v. 6, p. 320-30, 2012.

LAI, L. H.; FU, Q. H.; LIU, Y.; JIANG, K.; GUO, Q. M.; CHEN, Q. Y.; YAN, B.; WANG, Q. Q.; SHEN, J. G. Piperine suppresses tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, p. 523-30, 2012.

LAROUX, F. S.; PAVLICK, K. P.; HINES, I. N.; KAWACHI, S.; HARADA, H.; BHARWANI, S.; HOFFMAN, J. M. Role of nitric oxide in inflammation. **Acta Physiologic Scandinave**, v. 173, p. 113-8, 2001.

LARROSA, M.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C. Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4576-84, 2003.

LAVETI, D.; KUMAR, M.; HEMALATHA, R.; SISTIA R.; NAIDU, V. G.; TALLA, V.; VERMA V.; KAUR, N.; NAGPAL, R. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 349-61, 2013.

LE CORRE, L.; CHALABI, N.; DELORT, L.; BIGNON, Y. J.; BERNARD-GALLON, D. J. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms. **Molecular nutrition & food research**, v. 49, n. 5, p. 462-71, 2005.

LEE, B.; MOON, S. K. Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced proliferation and matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 12, p. 2767-73, 2005.

LEE, E. B.; FLEISCHMANN, R.; HALL, S.; WILKINSON, B.; BRADLEY, J. D.; GRUBEN, D.; KONCZ, T.; KRISHNASWAMI, S.; WALLESTEIN, G. V.; ZANG, C.; ZWILLICH, S. H.; VOLLENHOVEN, R. F. Tofacitinib versus Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 25, p. 2377-87, 2014.

LEE, J. A.; HA, S. K.; CHO, E.; CHOI, I. Resveratrol as a bioenhancer to improve anti-inflammatory activities of apigenin. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9650-61, 2015.

LEIGHL, N. B.; DENT, S.; CLEMONS, M.; VANDENBERG, T. A.; TOZER, R.; WARR, D. G.; CRUMP, R. M.; HEDLEY, D.; GREGORY, R. A phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 108, n. 1, p. 87-92, 2008.um grupa

LI, J.; HSU, H. C.; MOUNTZ, J. D. Managing Macrophages in Rheumatoid Arthritis by Reform or Removal. **Current Rheumatology Reports**, v. 14, n. 5, p. 445-54, 2012.

LI, C.; XIAOFEI, X.; WANG, X. J.; PAN, Y. Imine Resveratrol Analogues: Molecular Design, Nrf2 Activation and SAR Analysis. **Plos One**, v. 9, n. 7, e101455, 2014.

LIMA, L. L.; LIMA, R. M.; SILVA, A. F.; CARMO, A. M. R.; DA SILVA, A. D.; RAPOSO, N. R. B. Azastilbene Analogs as Tyrosinase Inhibitors: New Molecules with Depigmenting Potential. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

LIPINSKI, C. A. Computational alerts for potential absorption problems: profiles of clinically tested drugs, in: **Tools for Oral Absorption**. Part Two. Predicting Human Absorption. BIOTEC, PDD symposium, AAPS, Miami, 1995.

LIPSKY, P. E.; ROSENTHAL, A. S. Macrophage-lymphocyte interaction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 138, n. 4, p. 900-24, 1973.

LOBO-SILVA, D.; CARRICHE, G. M.; CASTRO, A. G.; ROQUE, S.; SARAIVA, M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, p. 297, 2016.

LONGBRAKE, E. E.; RACKE, M. K. Why did IL-12/IL-23 antibody therapy fail in multiple sclerosis? **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 9, n. 3, p. 319-21, 2009.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 4, p. 221-33, 2006.

LU, J.; LI, C.; CHAI, Y. E.; YANG, D. Y.; SUN, C. R. The antioxidant effect of imine resveratrol analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 17, p. 5744-7, 2012.

LUCKEERAM, R. V.; ZHOU, R.; VERMA, A. D.; XIA, B. CD4<sup>+</sup> T cells: differentiation and functions. **Clinical and Developmental Immunology Journal**, v. 2012, p. 925132, 2012.

LUNESHI, N. M.; ROTHWELL, N. J.; BROUGH, D. Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: implications for anti-interleukin-1 therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 8, p. 1318-29, 2009.

MA, C.; WANG, Y.; DONG, L.; LI, M.; CAI, W. Anti-inflammatory effect of resveratrol through the suppression of NF- $\kappa$ B and JAK/STAT signaling pathways. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 47, n. 3, p. 207-13, 2015.

MA, Y.; POPE, R. M. The role of macrophages in rheumatoid arthritis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 569-80, 2005.

MACMIKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric Oxide and macrophage functions. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-50, 1997.

MAO, K.; CHEN, S.; CHEN, M.; MA, Y.; WANG, Y.; HUANG, B.; HE, Z.; ZENG, Y.; HU, Y.; SUN, S.; LI, J.; WU, X.; WANG, X.; STROBER, W.; CHEN, C.; MENG, G.; SUN, B. Nitric Oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. **Cell Research**, v. 23, n. 2, p. 201-12, 2013.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 45, p. 594-98, 1968.

MARK CUSHMAN, DHANAPALAN NAGARATHNAM, D. GOPAL, ROBERT L. GEAHLEN, Synthesis and evaluation of new protein-tyrosine kinase inhibitors. Part 2. Phenylhydrazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, p. 215-8, 1991.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-7, 1997.

METRI, K.; BHARGAV, H.; CHOWDHURY, P.; KOKA, P. S. Ayurveda for chemo-radiotherapy induced side effects in cancer patients. **Journal of stem cells**, v. 8, n. 12, p. 115-29, 2013.

MEYER, M.; SCHRECK, R.; BAEUERLE, P. A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 8, p. 2005-15, 1993.

MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: fundamentos de patologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 176-201, 2006.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Review**, v. 22, n. 2, p. 240-73, 2009.

MOON, S. O.; KIM, W.; SUNG, M. J.; LEE, S.; KANG, K. P.; KIM, D. H.; LEE, S. Y.; SO, J. N.; PARK, S. K. Resveratrol suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced fractalkine expression in endothelial cells. **Molecular Pharmacology**, v. 70, p.112-9, 2006.

MORAIS, N. C. R.; BARBOSA, A. M.; VALE, M. L.; VILLAVERDE, A. B.; LIMA, C. J. L.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. **Biomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, p. 227-32, 2010.

MORRIS, V. L.; TOSEEF, T.; NAZUMUDEEN, F. B.; RIVOIRA, C.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; ROTENBERG, S. A. Antitumor properties of cis-resveratrol methylated analogs in metastatic mouse melanoma cells. **Molecular and Cell Biochemistry**, v. 402, n. 1-2, p. 83-91, 2015.

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

MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL. C. V.; PEREIRA, I. A.; REZENDE-FRONZA, L. S.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V. C.; SILVA, N. A.; LOUZADA-JÚNIOR, P.; GIORGI, R. D. N.; LIMA, R. A. C; PINHEIRO, G. R. C. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, **52 (2)**:135-74, 2012.

MURDOCH, J. R.; LLOYD, C. M. Chronic inflammation and asthma. **Mutation Research**, v. 690, n. 1-2, p. 24-39, 2010.

MURPHY, K. A. **Imunobiologia de Janeway**. 8<sup>th</sup> ed. Artmed Editora, 2014. 888p.

MURPHY, K. A.; GRIFFITH, T. S. CD8 T Cell–Independent Antitumor Response and Its Potential for Treatment of Malignant Gliomas. **Cancer**, v. 8, n. 8, p. 71, 2016.

NA, L.; WU, X.; FENG, R.; LI, J.; HAN, T.; LIN, L.; LAN, L.; YANG, C.; LI, Y.; SUN, C. The Harbin Cohort Study on Diet, Nutrition and Chronic Non-Communicable diseases: Study Design and Baseline Characteristics. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0122598, 2015.

NAKAGAWA, H.; KIYOZUKA, Y.; UEMURA, Y.; SENZAKI, H.; SHIKATA, N.; HIOKI, K.; TSUBURA, A. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. **Journal of Cancer Research Clinnical Oncology**, v. 127, n. 4, p. 258-64, 2001.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-885, 2002a.

NATHAN, C. What can immunology contribute to control of the world's leading cause of death from bacterial infection? **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 2-5, 2015b.

NGUYEN, A. V.; MARTINEZ, M.; STAMOS, M. J.; MOYER, M. P.; PLANUTIS, K.; HOPE, C.; HOLCOMBE, R. F. Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer. **Cancer Management and Research**, v. 1, p. 25-37, 2009.

NUTRIEVA, R.; YANG, X. O.; MARTINEZ, G. *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 480–483, 2007.

OCEAN A, VAHDAT L. Chemotherapy induced peripheral neuropathy: pathogenesis and emerging therapies. **Supportive Care in Cancer**, v. 12, n. 9, p. 619-25, 2004.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K. I.; MACHADO, A.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 260-265, 2011.

O'NEILL, L. A. J. Interleukin-1 signal transduction. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 25, p. 169-77, 1995.

ORANGE, J. S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 713-35, 2008.

ORTEGA, E.; PETERS, C.; BARRIGA, C.; LOTZERICH, H. A atividade física reduz o risco de câncer? **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 4, n. 3, p. 81-86, 1998.

OSCHMAN, J. L.; CHEVALIER, G.; BROWN, R. The effects of grounding (earthing) on inflammation, the immune response, wound healing, and prevention and treatment of chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Journal of Inflammation Research**, v. 8, p. 83-96, 2015.

OUYANG, X.; YANG, Z.; ZHANG, R.; ARNABOLDI, P.; LU, G.; LI, Q.; WANG, W.; ZHANG, B.; CUI, M.; ZHANG, H.; LIANG, J. Q.; ZHENG, F.; HUANG, B.; XIONG, H. Potentiation of TH17 cytokines in aging process contribute to the development of colitis. **Cellular Immunology**, v. 266, n. 2, p. 208-17, 2011.

PAJOUHESH, H.; LENZ, G. R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. **NeuroRx**, v. 2, n. 4, p. 541-53, 2005.

PANCIONE, M.; Giordano, G.; Remo, A.; Febbraro, A.; Sabatino, L.; Manfrin, E.; Ceccarelli, M.; Colantuoni, V. Immune escape mechanisms in colorectal cancer pathogenesis and liver metastasis. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, n. 686879, 2014.

PARK, H. G.; LEE, Y. R.; JUN, J. K.; LEE, W. L. Exercise training is more effective than resveratrol supplementation on alleviation of inflammation in peritoneal macrophages of high fat diet mice. **Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 79-87, 2014.

PATEL, K. R.; BROWN, V. A.; JONES, D. J.; BRITTON, R. G.; HEMINGWAY, D.; MILLER, A. S.; WEST, K. P.; BOOTH, T. D.; PERLOFF, M.; CROWELL, J. A.; BRENNER, D. E.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J.; BROWN, K. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer Research**, v. 70, n. 19, p. 7392-9, 2011.

PAVAN F. R.; CARVALHO, G. S. G.; DA SILVA, A. D.; LEITE C.Q.F. Synthesis and Anti Mycobacterium tuberculosis Evaluation of Aza-Stilbene Derivatives. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 1113-9, 2011.

PAWAR, V.; GOHIL, V.; TAMBOLI, R.; GIRIDAR, R.; YADAV, M. R. Cartilage targeted chemical delivery of naproxen and ibuprofen for the treatment of arthritis. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, p. S10-1, 2012.

PELEGRIN, P.; BARROSO-GUTIERREZ, C.; SURPRENANT, A. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7147-57, 2008

PENTHALA, N. R.; THAKKAR, S.; CROOKS, P. A. Heteroaromatic analogs of the resveratrol analog DMU-212 as potent anti-cancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 14, p. 2763-7, 2015.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 12, p. 1805-12, 2003.

PIKARSKY, E.; PORAT, R. M.; STEIN, I.; ABRAMOVITCH, R.; AMIT, S.; KASEM, S.; GUTKOVICH-PYEST, E.; URIELI-SHOVAL, S.; GALUN, E.; BEN-NERIAH, Y. NF-Kb functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 23, p. 461-6, 2004.

PINTO, N. C.; MACHADO, D. C.; DA SILVA, J. M.; CONEGUNDES, J. L.; GUALBERTO, A. C.; MOREIRA, L. C.; CASTANON, M. C.; SCIO, E. Pereskia aculeata Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330-7, 2015.

PODOJIL, J. R.; MILLER, S. D. Molecular Mechanisms of T cell Receptor and Costimulatory Molecule Ligation/Blockade in Autoimmune Disease Therapy. **Immunology Reviews**, v. 229, n. 1, p. 337-55, 2009.

POLONINI, H. C.; LIMA, L. L.; GONÇALVES, K. M.; DO CARMO, A. M.; DA SILVA, A. D.; RAPOSO, N. R. B. Photoprotective activity of resveratrol analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 964-8, 2013.

- POZO-GUISADO, E.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; MULERO-NAVARRO, S.; SANTIAGO-JOSEFAT, B.; FERNANDEZ-SALGUERO, P. M. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer: cell-specific alteration of the cell cycle. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 9, p. 1375-86, 2002.
- POPE, R. M.; SHAHRARA, S. Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews in Rheumatology**, v. 9, n. 4, p. 252-6, 2013.
- PULLI, B.; ALI, M.; FORGHANI, R.; SCHOB, S.; HSIEH, K. L. C.; WOJTKIEWICZ, G.; LINNOILA, J. J.; CHEN, J. W. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **Plos One**, v. 8, n. 7, e67976, 2013.
- PULSATELLI, L.; ADDIMANDA, O.; BRUSI, V.; PAVLOSKA, B.; MELICONI, R. New findings in osteoarthritis pathogenesis: therapeutic implications. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 4, n. 1, p. 23-43, 2013.
- QUANDT, D.; HOLF, H.; RUDOLPH, M.; FILATREAU, S.; BRUNNER, M. C. W. A New Role of CTLA-4 on B Cells in Thymus-Dependent Immune Responses In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 11, p. 7316-24, 2007.
- QUASTHOFF S, HARTUNG H. Chemotherapy-induced Peripheral neuropathy. **Journal of Neurology**, v. 249, n. 1, p. 9-17, 2002.
- QUEIROZ, A . N.; GOMES, B. A. Q. G.; MORAES JR., W. M. *et al.* A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1644-49, 2009.
- QURESHI, A.A.; GUAN, X. Q.; REIS, J. C.; JABRE, S.; MORRISON, D. C.; QURESHI, N. Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, p. 76, 2012.
- QURESHI, A.A.; KARPEN, C. W.; QURESHI, N.; PAPASIAN, C. J.; MORRISON, D. C.; FOLTS, J. D. *Tocotrienols-induced inhibition of platelet thrombus formation and platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries.* **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 58. 2011a.
- QURESHI, A.A.; REIS, J. C.; QURESHI, N.; PAPASIAN, C. J.; MORRISON, D. C. SCHAEFER, D. M. delta-Tocotrienol and quercetin reduce serum levels of nitric oxide and lipid parameters in female chickens. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 39, 2011b.
- QURESHI, A.A.; XIAOYU, T.; REIS, J. C.; BADR, M. Z.; PAPASIAN, C. J.; MORRISON, D. C.; QURESHI, N. Suppression of nitric oxide induction and pro-inflammatory cytokines by novel proteasome inhibitors in various experimental models. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 177, 2011c.
- RACHON, D.; RIMOLDI, G.; WUTTKE, W. *In vitro* effects of genistein and resveratrol on the production of interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) and interleukin-10

(IL-10) by stimulated murine splenocytes. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 419-24, 2006.

RAGIONE, F. D., CUCCIOLLA, V., BORRIELLO, A., PIETRA, V. D., RACIOPPI, L., SOLDATI, G., MANNA, C., GALLETTI, P., AND ZAPPIA, V. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. **Biochemical and Biophysical Research Community**, **250**: 53–8, 1998.

REN, Z.; WANG, L.; CUI, J.; HUOC, Z.; XUE, J.; CUI, H.; MAO, Q.; YANG R. Resveratrol inhibits NFkB signaling through suppression of p65 and I $\kappa$ B kinase activities. **Pharmazie**, v. 68, n. 8, p. 89-94, 2013.

RICCIOTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; BENINK, A. H.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. 2013. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; NELSON, H. **Assay guidance manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and National Center for Advancing Translational Sciences. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Acesso em: 12 ago. 2015.

ROCHA, F. A. C.; ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E. B.; JANCAR, S.; CUNHA, F. C.; RIBEIRO, R. A. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 4, p. 206-17, 2003.

schiROMAN, G. Mannich bases in medicinal chemistry and drug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 743- 816, 2015.

ROSMAN, Z.; SHOENFELD, Y.; ZANDMAN-GODDARD, G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. **BioMed Central Medicine**. v. 11, p. 88, 2013.

RYU, J.; KU, B. M.; LEE, Y. K.; JEONG, J. Y.; KANG, S.; CHOI, J.; YANG, Y.; LEE, D. H.; ROH, G. S.; KIM, H. J.; CHO, G. J.; CHOI, W. S.; KIM, N.; KANG, S. S. Resveratrol reduces TNF- $\alpha$ -induced U373MG human glioma cell invasion through regulatinf NF- $\kappa$ B activation and uOA/uPAR expression. **Anticancer Research**, v. 31, p. 4223-30, 2011.

SAGE, P. T.; PETERSON, A. M.; LOVITCH, S. B.; SHARPE, A. H. The coinhibitory receptor CTLA-4 Controls B cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory and T Regulatory Cells. **Immunity**, v. 41, n. 6, p. 1026-39, 2014.

SAITO, M.; SATOH, S.; KOJIMA, N.; TADA, H.; SATO, M.; SUZUKI, T.; SENCO, H.; HABUCHI, T. Effects of a phenolic compound, resveratrol, on the renal function and costimulatory adhesion molecule CD86 expression in rat kidneys with ischemia/reperfusion injury. **Archives of Histology and Cytology**, v. 68, n. 1, p. 41-9, 2005.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829-38, 1996.

SANCHEZ-ESPIRIDION, B.; MARTIN-MORENO, A. M.; MONTALBAN, C.; MEDEIROS, L. J.; VEGA, F.; YOUNES, A.; PIRIS, M. A.; GARCIA, J. F. Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. **Haematologica**, v. 97, n. 7, p. 1080-4, 2012.

SANTOS, J. A.; LIMA, R. M.; PEREIRA, T. V.; MARCO, A. M. R.; RAPOSO, N. R. B.; SILVA, A. D. Antioxidant Activity of Thio-Schiff Bases. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 10, n. 7, p. 557-560, 2013.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 227-35, 2011.

SARMIENTO-MONROY, J.C.; AMAYA-AMAYA, J.; ESPINOSA-SERNA, J. S.; HERRERA-DÍAZ, C.; ANAYA, J. M.; ROJAS-VILLARRAGA, A. Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Literature Review in Latin America. **Arthritis**, v. 2012, p. 1-17, 2012.

SAVIO, M.; FERRARO, D.; MACCARIO, C.; VACCARONE, R.; JENSEN, L. D.; CORANA, F.; MANNUCCI, B.; BIANCHI, L.; CAO, Y.; STIVALA, L. A. Resveratrol analogue 4,4'-dihydroxi-trans-stilbene potently inhibits cancer invasion and metastasis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19973, 2016.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMAN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 437-42, 2005.

SAWADA, N. O.; NICOLUSSI, A. C.; OKINO, L.; CARDOZO, F. M. C.; ZAGO, M. M. F. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 43, n. 3, p. 581-7, 2008.

SAXNE, T.; WALHEIM, F. A. Cyclosporine A in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Disorders**, v. 62, p. 1121-6, 2003.

SCHETT, G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: Osteoclasts. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2007.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; SILVA, G. A.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO, S. M.; CHOR, D.; MENEZES, P. R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, p. 1949-61, 2011.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-89, 2004.

SCHOTTENFELD, D.; DIMMER, J. B. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. **CA Cancer Journal of Clinicians**, v. 56, p. 69-83, 2006.

SEPE, S. M.; CLARK, R. A. Oxidant membrane injury by the neutrophil myeloperoxidase system. II. Injury by stimulated neutrophils and protection by lipid-soluble antioxidants. **The Journal of Immunology**, v. 134, n. 3, p. 1896-1901, 1985

SHAKIBAEI, M.; JOHN, T.; SEIFARTH, C.; MOBASHERI, A. Resveratrol inhibits IL-1 $\beta$ -induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human Articular Chondrocytes *in vitro*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1095, p. 554-63, 2007.

SHARMA, G. N.; DAVE, R.; SANADYA, J.; SHARMA, P.; SHARMA, K. K. Various types and management of breast cancer: an overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 2, p. 109-26, 2010.

SHARMA, S.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S. K.; AGREWALA, J. N. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 147, n. 1, p. 155-63, 2007.

SHARP, J. T.; STRAND, V.; LEUNG, H.; HURLEY, F.; LOEW-FRIERICH, I. Treatment with leflunomide slows radiographic progression of rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, p. 495-505, 2000.

SHI, X. P.; MIAO, S.; WU, Y.; ZHANG, X. F.; MA, H. Z.; XIN, H. L.; FENG, J.; WEN, A. D.; LI, Y. Resveratrol Sensitizes Tamoxifen in Antiestrogen-Resistant Breast Cancer Cells with Epithelial-Mesenchymal Transition Features. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, n. 8, p. 15655-68, 2013.

SIDDIQUI, A.; DANDAWATE, P.; RUB, R.; PADHYE, S.; APHALE, S.; MOGHE, A.; JAGYASI, A.; VENKATESWARA SWAMY, K.; SINGH, B.; CHATTERJEE, A.; RONGHE, A.; BHAT, H. K. Novel Aza-resveratrol analogs: synthesis, characterization and anticancer activity against breast cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 3, p. 635-40, 2013.

SIEGELMAN, M. H.; STANESCU, D.; ESTESS, P. The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 683-691, 2000.

SILVA, C. B.; ALBUQUERQUE, V.; LEITE, J. Qualidade de vida em pacientes portadoras de neoplasia mamária submetidas a tratamentos quimioterápicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 2, p. 227-36, 2010.

SMITH, M. J.; HAYAKAWA, Y.; TAKEDA, K.; YAGITA, H. New aspects of natural-killer surveillance and therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 850-61, 2002.

SO, A. Y. L.; GARCIA-FLORES, Y.; MINISANDRAM, A.; MARTIN, A.; TAGANOV, K.; BOLDIN, M.; BALTIMORE, D. Regulation of APC development, immune response, and autoimmunity by Bach1/HO-1 pathway in mice. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2428-37, 2012.

SOARES-FILHO, P. R.; CASTRO, I.; STAHLSCHMIDT, A. Efeito do vinho tinto associado ao exercício físico no sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 4, p. 277-83, 2011.

SORENSEN, T. L.; RANSOHOFF, R. M.; STRIETER, R. M.; SELLEBJERG, F. Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. **European Journal of Neurology**, v. 11, n. 7, p. 445-9, 2004.

SOUZA, A. W. S.; MESQUITA JR., D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte III. O delicado equilíbrio do Sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 665-94, 2010.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-12, 2004.

STAKLEFF, K. S.; SLOAN, T.; BLANCO, D.; MARCANTHONY, S.; BOOTH, T. D.; BISHAYEE, A. Resveratrol exerts differential effects *in vitro* and *in vivo* against ovarian cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 1333-41, 2012.

STEWART, J. R.; CHRISTMAN, K. L.; O'BRIAN, C. A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 9, p. 1355-9, 2000.

STRIZ, I.; BRABCOVA, E.; KOLESAR, L.; SEKERKOVA, A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. **Clinical Science**, v. 126, n. 9, p. 593-612, 2014.

SUAREZ-ALMAZOR, M. E.; BELSECK, E.; SHEA, B.; WELLS, G.; TUGWELL, P. Methotrexate for rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Systematic Review**, v. 2, CD000957, 2000.

SUI, X.; MA, J.; HAN, W.; WANG, X.; FANG, Y.; LI, D.; PAN, H.; ZHANG, L. The anticancer immune response of anti-PD-1/PD-L1 and the genetic determinants of response to anti-PD-1/PD-L1 antibodies in cancer patients. **Oncotarget**, v. 6, n. 23, p. 19393-404, 2015.

- SUN, C.; HU, Y.; LIU, X.; WU, T.; WANG, Y.; HE, W.; WEI, W. Resveratrol downregulates the constitutional activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 165, n. 1, p. 9-19, 2006.
- SUN, L.; HE, C.; NAIR, L.; YEUNG, J.; EGWUAGU, C. E. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 249-55, 2015.
- SVAJGER, U.; JERAS M. Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. **International Reviews of Immunology**, v. 31, p. 202–22, 2012.
- SVAJGER, U.; OBERMAJER, N.; JERAS, M. Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. **Immunology**, v. 129, p. 525-35, 2009.
- TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kB: a key role inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, 7-11, 2001.
- TAK, P. P.; ZVAIFLER, N. J.; GREEN, D. R.; FIRESTEIN, G. S. 2000. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. **Immunology Today**, v. 21, p. 78–82.
- TAKIZAWA, Y.; NAKATA, R.; FUKUHARA, K.; YAMASHITA, H.; KUBODERA, H.; INOUE, H. The 4'-hydroxyl group of resveratrol is functionally importante for direct activation of PPAR $\alpha$ . **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0120865, 2015.
- TANG, D.; KANG, R.; COYNE, C. B.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T. PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 158-75, 2013.
- TANG, F. Y.; SU, Y. C.; CHEN, N. C.; HSIEH, H. S.; CHEN, K. S. Resveratrol inhibits migration and invasion of human breast-cancer cells. **Molecular Research & Food Research**, v. 52, n. 6, p. 683-91, 2008.
- TATLA, S.; WOODHEAD, V.; FOREMAN, J. C.; CHAIN, B. M. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, n. 1-2, p. 14-24, 1999.
- THOMAS, J.; JEJCIC, A.; VERVAEKE, P.; ROMAGNOLI, R.; LIEKENS, S.; BALZARINI, J.; DEHAEN, W. Structure-activity relationship pf tumor-selective 5-substitued 2-amino-3-carboxymethylthiophene derivatives. **ChemMedChem**, v. 9, n. 12, p. 2744-53, 2014.
- TRINCHERI, N. F.; NICOTRA, G.; FOLLO, C.; CASTINO, R.; ISIDORO, C. Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 5, p. 922-31, 2007.

TRINCHIERI, G., Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133-46, 2003.

TROTTA, V.; LEE, W. H.; LOO, C. Y.; HAGHI, M.; YOUNG, P. M.; SCALIA, S.; TRAINI, D. *In vitro* biological activity of resveratrol using a novel inhalable resveratrol spray-dried formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1-2, p. 190-7, 2015.

TSAI, S.H.; LIN-SHIAU S. Y.; LIN, J.K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 3, p. 673-80, 1999.

TSAN, M. F.; WHITE, J. E.; MAHESHWARI, J. G.; BREMNER, T. A.; SACCO, J. Resveratrol induces Fas signaling-independent apoptosis in THP-1 human monocytic leukemia cells. **Brazilian Journal of Haematology**, v. 109, p. 405–12, 2000.

UNWIN, N.; ALBERTI, K. G. Chronic non-communicable diseases. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 100, n. 5-6, p. 455-64, 2006.

VAN GINKEL, P. R.; SAREEN, D.; SUBRAMANIAN, L.; WALKER, Q.; DARJATMOKO, S. R.; LINDSTROM, M. J.; KULKARNI, A.; ALBERT, D. M.; POLANS, A. S. Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 17, p. 5162-9, 2007.

VIEIRA, F. M. A. C.; SENA, V. O. D. Câncer colorretal metastático: papel atual dos anticorpos monoclonais e a individualização de seu uso. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v. 22, n. 1, p. 45-9, 2009.

VOLP, A. C. P.; ALFENAS, R. C. G.; COSTA, N. M. B.; MINIM, V. P. R.; STRINGUETA, P. C.; BRESSAN, J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 537-49, 2008.

VYVEY, M. Steroids as pain relief adjuvants. **Canadian Family Physician**, v. 56, n. 12, p. 1295-7, 2010.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E. J.; WALLE, K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-82, 2004.

WANG, J.; COX, D. G.; DING, W.; HUANG, G.; LIN, Y.; LI, C. Three new resveratrol derivatives from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2840-50, 2014.

WANG R.F. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. **Trends Immunology**, v. 22, p. 269–276, 2001.

WANG, S.; WILLENBERG, I.; KROHN, M.; HECKER, T.; MECKELMANN, S.; LI, C.; SCHEBB, N. H.; STEINBERG, P.; EMPL, M. T. Growth-Inhibiting Activity of

Resveratrol Imine Analogs on Tumor Cells *In Vitro*. **Plos One**, v. 12, n. 1, e01701502, 2017.

WANG, Y.; ROMIGH, T.; HE, X.; ORLOFF, M. S.; SILVERMAN, R. H.; HESTON, W. D.; ENG, C. Resveratrol regulates the PTEN/AKT pathway through androgen receptor-dependent and –independent mechanisms in prostate cancer cell lines. **Human Molecular Genetics**, **19 (22)**:4319-29, 2010.

WATANABE, S.; BRUERA, E. Corticosteroids as adjuvant analgesics. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 9, n. 7, p. 442-5, 1994.

WELLS, T. N. C. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? **Malaria Journal**, v. 10, suppl 1, p. S3, 2011.

WESOŁOWSKA, A.; GROŚ, Ł.; WESTERLICH, S.; JAGODZIŃSKI, T.S. Synthesis and reactions of p-hydroxythiobenzamides. **ARKIVOC**, v. XV, p. 239-55, 2008.

WIBELINGER, L. M.; BORGES, A. M. Hidrocinesioterapia em Portadores de Artrite Reumatoide. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10, n. 31, p. 66-1, 2012.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, v. 226, p. 352-64, 2012.

WINTERBOURN, C. C.; VAN DEN BERG, J. J. M.; ROITMAN, E.; KUYPERS, F. A. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v. 296, n. 2, p. 547-555, 1992.

WOLCHOK, J. D.; SAENGER, Y. The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. **Oncologist**, v. 4, p. 2-9, 2008.

WOLMARK, N.; DUNN, B. K. The role of tamoxifen in breast cancer prevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 949, p. 99-108, 2001.

WU, S. L.; PAN, C. E.; YU, L.; MENG, K. W. Immunosuppression by combined use of cyclosporine and resveratrol in a rat liver transplantation model. **Transplantation Proceedings**, v. 37, n. 5, p. 2354-9, 2005a.

WU, S. L.; YU, L.; MENG, K. W.; MA, Z. H.; PAN, C. E. Resveratrol prolongs allograft survival after liver transplantation in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 30, p. 4745-9, 2005b.

XUZHU, G.; KOMAI-KOMA, M.; LEUNG, B. P.; HOWE, H. S.; MCSHARRY, C.; MCINNES, I. B.; XU, D. Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, p. 129-135, 2012.

YANG, T. J.; HO, A. Y. Radiation therapy in the management of breast cancer. **The Surgical clinics of North America**, v. 93, n. 2, p. 455-71, 2013.

- YI, C. O.; JEON, B. T.; SHIN, H. J.; JEONG, E. A.; CHANG, K. C.; LEE, J. E.; LEE, D. H.; KIM, H. J.; KANG, S. S.; CHO, G. J.; CHOI, W. S.; ROH, G. S. Resveratrol activates AMPK and suppresses LPS-induced NF- $\kappa$ B-dependent COX-1 activation on RAW 264.7 macrophage cells. **Anatomy & Cell Biology**, v. 44, n. 3, p.194-203, 2011.
- YOUNG, J. S.; CHEN, J.; MILLER, M. L.; VU, V.; TIAN, C.; MOON, J. J.; ALEGRE, M. L.; SCIAMMAS, R.; CHONG, A. S. Delayed Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Protein 4–Immunoglobulin Treatment Reverses Ongoing Alloantibody Responses and Rescues Allografts From Acute Rejection. **American Journal of Transplantation**, v. 16, n. 8, p. 2312-23, 2016.
- ZAGOTTA, I.; DIMOVA, E. Y.; DEBATIN, K. M.; WABITSCH, M.; KIETZMANN, T.; POSOVSZKY, P. F. Obesity and inflammation: reduced cytokine expression due to resveratrol in a human *in vitro* model of inflamed adipose tissue. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 79, 2015.
- ZAMAI, L.; AHMAD, M.; BANNET, I. M.; AZZONI, L.; ALNEMRI, E. S.; PERUSSIA, B. Natural Killer (NK) Cell–mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 12, p. 2375-80, 1998.
- ZARAVINOS, A. An update overview of HPV-associated head and neck carcinomas. **Oncotarget**, v. 5, n. 12, p. 3956-61, 2014.
- ZETNER, D.; ANDERSEN, L. P.; ROSENBERG, J. Pharmacokinetics of alternative administration routes of melatonin: a systematic review. **Drug Research**, v. 66, n. 4, p. 169-73, 2016.
- ZHONG, C.; LIU, X. H.; YU, J. M.; SUN, X. Inhibitory effect of resveratrol dimerized derivatives on nitric oxide production induced RAW 264.7 cells. **Bioorganic and Medicine Chemistry Letters**, v. 23, n. 15, p. 4413-8, 2013.
- ZHOU, J. H.; CHENG, H. Y.; YU, Z. Q.; HE, D. W.; PAN, Z.; YANG, D. T. Resveratrol induces apoptosis in pancreatic cells. **Clinical Medicine Journal**, v. 124, n. 11, p. 1695-9, 2011.
- ZIMMERMANN-FRANCO, D. C.; CARVALHO, G.S.G.; ROCHA, P. R.; TEIXEIRA, R. S.; SILVA, A.D.; RAPOSO, N. R. B. Inhibitory Effects of Resveratrol Analogs on Mushroom Tyrosinase Activity. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 11816-25, 2012.
- ZONG, Y.; LIN, S.; BIN, L.; DENG, Y. S.; ZHAN, D.; YUAN, L. C.; HE, Y.; LIU, J.; ZHANG, Z. J.; SUN, J.; LU, D. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44107, 2012.

