

JAQUELINE COSTA CASTARDO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
BRUTO DA *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO AGUDA EM
CAMUNDONGOS**

CURITIBA

2007

JAQUELINE COSTA CASTARDO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
BRUTO DA *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO AGUDA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante o Curso de Pós-graduação em Farmacologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida
Cabrini

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Lia Rieck

CURITIBA

2007

*A mente que se abre a uma nova idéia
jamaiz voltará ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus que, de diversas formas, me enviou fé, força, determinação e autoconfiança para concluir esse trabalho. E neste período, apresentou-me a abençoada oportunidade de me tornar uma pessoa melhor, mais madura e consciente.

Aos meus pais, Nivaldo e Maria Helena, meu porto seguro, e minha irmã Patrícia, que me deram não apenas o importante suporte financeiro, mas o apoio emocional, presente no colo carinhoso, no telefonema entre lágrimas, na paciência e nas muitas orações. Vocês foram essenciais para que eu perseverasse diante das dificuldades encontradas.

Agradeço ao Flávio, meu querido "mozão", obrigada pela força, pelo carinho, pela companhia mesmo à distância, pela tolerância e paciência. Obrigada por me amar. Junto com meus pais, você acompanhou e me ajudou a superar todos os obstáculos. Obrigada amor. Obrigada também à sua família, que também se tornou minha! Especialmente Edna, Júnior e Fer, vocês são pessoas incrivelmente especiais! Obrigada por me acolherem.

Minha querida e numerosa família: primas, primos, tias, tios e minhas amadas avós! Muito obrigada por sua presença em minha vida. Pela confiança, pelo amor, pela amizade, enfim, obrigada por serem a minha família.

Ao meu grande "amigo", agradeço por ser minha irmã, amiga, companheira, confidente, até mãe. Obrigada por me dar força e por fazer meu jantar quando eu mais precisei. Obrigada por tudo Haline.

Agradeço especialmente ao tio Juscelino, tia Neusa, sua família e amigos queridos, que também se tornaram minha família e meus amigos durante todo esse período de convivência. Vocês me mostraram que a família pode estar em todos os lugares.

Agradeço às minhas queridas amigas, que mesmo à distância, sempre estiveram presentes em meus pensamentos, em minhas orações, em minha vida. Obrigada por torcerem por mim, fias queridas!

Agradeço principalmente a minha orientadora, Daniela Cabrini, e ao professor Michel Otuki, por me mostrarem, na prática, o mais nobre significado da palavra "orientar". Obrigada por serem exigentes, firmes, educadores, e ao mesmo tempo, amigos, divertidos, companheiros e interessados. Junto com os colegas e amigos do laboratório, vocês tornaram tudo mais leve e agradável. Vocês são exemplos a se seguir!

Agradeço a todos os professores do departamento de farmacologia, sempre prontos a ensinar e ajudar. Agradeço à professora Lia Rieck, por me aceitar como sua orientanda e me ajudar com as primeiras dificuldades da vida científica.

Agradeço aos grandes amigos que fiz durante a pós-graduação. Comecei sozinha e terminei sentindo-me parte de uma grande família. Não vou citar todos os nomes, pois sou muito esquecida e não quero cometer a enorme injustiça de me esquecer de alguém. Foram muitos colegas queridos e alguns amigos realmente especiais, como a Ana, o Eduardo e a Shirley, minha grande companheira de madrugadas, obrigada amiga!

Não posso deixar de agradecer a todos os funcionários da Universidade Federal do Paraná: às secretárias, técnicas e técnicos, faxineiras, a todos os responsáveis pelos serviços que tanto utilizei, como o biotério, muito obrigada.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro durante parte da pós-graduação.

Agradeço assim, a todos que fizeram parte deste caminho de crescimento profissional e pessoal. Que Deus abençoe vocês!

Obrigada!

RESUMO

A *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi (Clusiaceae) pode ser encontrada sob a sinonímia botânica de *Rheedia gardneriana* (Guttiferae) e é conhecida popularmente como “bacupari”. Na medicina popular, é indicada para o tratamento de inflamações, dores, infecções urinárias e outros tipos de infecções. O presente estudo investiga os possíveis efeitos antiinflamatórios dos extratos hidroalcoólicos da *G. gardneriana* (EHGG), no modelo de edema de pata induzido pela carragenina e outros mediadores inflamatórios em camundongos; e os efeitos antiedematogênicos de mais dois compostos isolados a partir do extrato produzido das folhas desta planta: o fukugetin e o GB-2a. Quando administrados nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, pela via oral (v.o.) ou, 30, 100 e 300 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), os extratos hidroalcoólicos da *G. gardneriana* produzidos a partir das folhas, cascas e sementes reduziram a inflamação induzida pela carragenina no modelo do edema de pata em até $39 \pm 5\%$, $78 \pm 10\%$ e $48 \pm 7\%$, para a v.o., e uma inibição máxima de $72 \pm 4\%$, $69 \pm 2\%$ e $41 \pm 11\%$ quando administrados por via i.p., respectivamente. Entretanto, a redução do edema apenas apresentou perfil dependente da dose para os extratos das cascas e das folhas, quando estes foram administrados por via i.p. (DI_{50} de 132,47 e 153,57 mg/kg, respectivamente). A avaliação da atividade dos biflavonóides fukugetin e GB-2a (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.), sobre o mesmo modelo mostrou que estes compostos são capazes de reduzir o edema de pata da carragenina ($38 \pm 4\%$ e $54 \pm 3\%$, respectivamente), sendo que o GB-2a age de forma dependente da dose (DI_{50} 78,36 mg/kg). Os EHGG das folhas, cascas e sementes também reduziram ($41 \pm 6\%$, $45 \pm 6\%$ e $23 \pm 6\%$, respectivamente) a atividade da enzima mieloperoxidase, sendo o EHGG das folhas o mais potente. A avaliação tempo-resposta do EHGG das folhas (300 mg/kg, i.p.) verificou o efeito inibitório sobre o edema de pata causado pela carragenina quando administrado até quatro horas antes e duas horas depois da indução do edema. O tratamento dos animais, com o mesmo extrato, causou redução na atividade da mieloperoxidase, no entanto não foi capaz de agir diretamente sobre a enzima isolada. Além disso, o EHGG das folhas promoveu importante redução do infiltrado leucocitário para o local do edema quando avaliado

histologicamente. Quando testado sobre a resposta inflamatória induzida por outros mediadores, o extrato das folhas reduziu os edemas provocados por injeções intraplantares de bradicinina ($48 \pm 16\%$), histamina ($42 \pm 7\%$) e prostaglandina E_2 ($80 \pm 3\%$). Entretanto, inibiu apenas parcialmente a inflamação gerada pela substância P e pelo composto 48/80 e não influenciou o edema provocado pela injeção intraplantar de ácido araquidônico. Ainda, o EHGG das folhas (300 mg/kg, i.p.), diminuiu parcialmente os edemas de orelha e de pata induzidos pela administração tópica e intraplantar do éster de forbol 12-*O*-tetradecanoilphorbol-13-acetato (TPA). Os resultados, analisados em conjunto, permitem sugerir que a ação antiinflamatória do EHGG produzido a partir das folhas, está relacionada à inibição de uma ou mais vias de sinalização intracelular envolvidas nos efeitos dos mediadores da resposta inflamatória, sem comprometer completamente a degranulação de mastócitos ou a formação de metabólitos do AA. Em síntese, a *Garcinia gardneriana*, principalmente as folhas, com sua constituição rica em metabólitos farmacologicamente ativos, possui importante efeito antiinflamatório. Estas características, somadas à ampla distribuição e fácil cultivo da planta, confirmam sua utilização popular e a colocam como promissora fonte para o desenvolvimento de alternativas aos antiinflamatórios em uso atualmente.

Palavras-chave:

Clusiaceae, *Garcinia gardneriana*, *Rheedia gardneriana*, inflamação, edema de pata em camundongo, mieloperoxidase, carragenina.

ABSTRACT

Garcinia gardneriana (Planchon & Triana) Zappi (Clusiaceae), which was designated before as *Rheedia gardneriana* (Guttiferae), popularly known as “bacupari”. It is popularly indicated to treat inflammation, pain, urinary infection and other infections. The present study examined the anti-inflammatory effects of the hydroalcoholic extracts from *G. gardneriana* (EHGG) on paw oedema induced by carrageenan or different inflammatory mediators, in mice; and also the antioedematogenic effect of two isolated compounds, fukugetin and GB-2a. The EHGG from leaves, bark and seeds (250, 500 and 1000 mg/kg, o.p. or 30, 100, 300 mg/kg, i.p.) reduced the paw inflammation induced by carrageenan ($39 \pm 5\%$, $78 \pm 10\%$ and $48 \pm 7\%$, or $72 \pm 4\%$, $69 \pm 2\%$ and $41 \pm 11\%$, respectively), but only the leaves and the bark extracts (i.p.), presented dose-related inhibitory effect (DI_{50} 132,47 and 153,57 mg/kg, respectively). In the same model, the biflavonoids fukugetin and GB-2a (10, 30 and 100 mg/kg, i.p.), show that both were capable of reduced the carrageenan-induced paw oedema ($38 \pm 4\%$ and $54 \pm 3\%$, respectively). However, only the compound GB-2a caused a dose-dependent inhibition (DI_{50} 78,36 mg/kg). The treatment of animals with EHGG from leaves, bark and seeds also reduced the myeloperoxidase activity ($41 \pm 6\%$, $45 \pm 6\%$ e $23 \pm 6\%$, respectively), being the leaves extract the most potent, but this extract did not change the enzyme activity when directly incubated. The time-response evaluation (300 mg/kg, i.p.) presented an effect of leaves extract over paw oedema formation when applied 4 hours before until 2 hours after carrageenan injection. The treatment with the EHGG from leaves promoted an important decrease of the cellular infiltrates to the inflammatory site when evaluated by histology. The extract also reduced the paw oedema induced by bradykinin ($48 \pm 16\%$), histamine ($42 \pm 7\%$) and prostaglandin E_2 ($80 \pm 3\%$), however it only partially decreased substance P and compound 48/80-caused paw oedema, without any influence on the arachidonic acid (AA)-induced oedema. The EHGG from leaves (300 mg/kg, i.p.) also partially inhibited the paw and ear oedema caused by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-acetate (TPA). The data from the current study show that the EHGG from leaves produce an important anti-inflammatory effect, through the interaction of a different intracellular signaling pathways (mediators), without

interfered with mast cell degranulation, or with the formation of AA-metabolites. Finally, *Garcinia gardneriana*, mainly leaves, with a rich gathering of pharmacologically active compounds, has an important anti-inflammatory effect. These characteristics, added to the generous distribution and easy culture of the plant, confirm its popular use and show it as a promising source to the development of new alternative compounds to the anti-inflammatory drugs currently in use.

Key-words:

Clusiaceae, *Garcinia gardneriana*, *Rheedia gardneriana*, inflammation, mice paw oedema, mieloperoxidase, carrageenan.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Resposta inflamatória aguda	17
1.2 Terapia antiinflamatória	35
1.3 Plantas com atividade antiinflamatória	41
1.4 <i>Garcinia gardneriana</i> (Pl. & Tr.) Zappi	48
2 OBJETIVOS	51
2.1 Objetivos gerais	52
2.2 Objetivos específicos	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Animais	54
3.2 Classificação botânica	54
3.3 Coleta, extração e preparo do material vegetal	54
3.4 Isolamento e purificação dos compostos	55
3.5 Drogas e soluções usadas	55
3.6 Métodos	56
3.6.1 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina em camundongos	56
3.6.2 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase	57
3.6.3 Avaliação histológica do edema de pata	58
3.6.4 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de diversos compostos	58
3.6.5 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de TPA (12 – O - tetradecanoilforbolacetato)	59
3.6.6 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA	59
3.7 Análise estatística	59
4 RESULTADOS	61
4.1 Efeito da administração oral do EHGG, produzido a partir da folha, casca e semente, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em camundongos	62

4.2	Efeito da administração intraperitoneal do EHGG, produzido a partir da folha, casca e semente, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em camundongos	66
4.3	Efeito da administração intraperitoneal do EHGG, produzido a partir da folha, casca e semente, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase, em patas de camundongos submetidos ao edema pela carragenina	70
4.4	Efeito da incubação do EHGG, produzido a partir da folha, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase de patas de camundongos submetidos ao edema pela carragenina	74
4.5	Avaliação curso temporal do efeito do EHGG das folhas, sobre a resposta máxima do edema de pata induzido pela carragenina	76
4.6	Análise histológica do efeito do EHGG das folhas, sobre o infiltrado celular de patas submetidas ao edema induzido pela carragenina	78
4.7	Efeito do tratamento com o EHGG das folhas sobre o edema de pata induzido por diversos mediadores, em camundongos	79
4.8	Efeito do tratamento com o EHGG das folhas sobre os edemas induzidos pelo éster de phorbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)	86
4.9	Efeito dos biflavonóides extraídos do EHGG das folhas sobre o edema de pata induzido pela carragenina	88
5	DISCUSSÃO	90
6	CONCLUSÕES	112
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Sequência de eventos envolvidos no recrutamento leucocitário.....	21
Figura 2:	Partes aéreas da <i>Garcinia gardneriana</i> (Pl. & Tr.) Zappi.....	48
Figura 3:	Biflavonóides da <i>Garcinia</i>	49
Figura 4:	Efeito do tratamento oral com o EHGG das folhas, sobre o edema de pata causado pela administração de carragenina em camundongos.....	63
Figura 5:	Efeito do tratamento oral com o EHGG das cascas, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos.....	64
Figura 6:	Efeito do tratamento oral com o EHGG das sementes, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos.....	65
Figura 7:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos.....	67
Figura 8:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das cascas, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos.....	68
Figura 9:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das sementes, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos.....	69
Figura 10:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em patas, 6 h após a indução de edema pela administração de carragenina, em camundongos.....	71
Figura 11:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das cascas, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em patas, 6 h após a indução de edema pela administração de carragenina, em camundongos.....	72
Figura 12:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das sementes, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em patas, 6 h após a indução de edema pela administração de carragenina, em camundongos.....	73
Figura 13:	Efeito da incubação do EHGG das folhas, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em patas, 4 h após a indução de edema	75

	pela administração de carragenina, em camundongos.....	
Figura 14:	Duração do efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre a 4 ^a hora do edema induzido pela administração intraplantar de carragenina, em camundongos.....	77
Figura 15:	Análise histológica do efeito do EHGG das folhas sobre o infiltrado leucocitário em patas submetidas ao edema pela carragenina.....	78
Figura 16:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de histamina, em camundongos.....	80
Figura 17:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de bradicinina, em camundongos.....	81
Figura 18:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de prostaglandina E ₂ (PGE ₂), em camundongos.....	82
Figura 19:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de substância P, em camundongos.....	83
Figura 20:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração do composto 48/80, em camundongos.....	84
Figura 21:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de ácido araquidônico, em camundongos.....	85
Figura 22:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de TPA, em camundongos.....	86
Figura 23:	Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela aplicação tópica de TPA, em camundongos.....	87
Figura 24:	Efeito do tratamento intraperitoneal com os biflavonóides fukugetin e GB-2a, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos.....	89
Figura 25:	Estrutura química do garcinol.....	102
Figura 26:	Vias de transdução envolvidas na ação dos mediadores BK, SP, HIS e PGE ₂	110

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
Ac	anticorpo
AINEs	antiinflamatórios não esteroidais
AP-1	proteína ativadora - 1
ARMD	agentes anti-reumatóides modificadores da doença
AR	artrite reumatóide
BK	bradicinina
COX	ciclooxigenase
DI ₅₀	dose que reduziu em 50 % a resposta quando comparado ao controle
EHGG	extrato hidroalcoólico da <i>Garcinia gardneriana</i>
E.P.M.	erro padrão da média
ERK	quinase ligada a sinais extracelulares
ESL	ligante da E-selectina
C5a	componente C5a do sistema complemento
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
5-HT	5-hidroxitriptamina
C3a	componente C3a do sistema complemento
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
GM-CSF	fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos
GR	receptor de glicocorticóide
GRE	elementos responsivos aos glicocorticóides
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HIS	histamina
HPETE	ácido hidroperoxieicosatetraenóico
HTAB	hexadeciltrimetilamônio
ICAM	molécula de adesão intercelular
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
I _{max}	inibição máxima
INF	intérferon
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
i.p.	intraperitoneal
i.pl.	intraplantar

LOX	lipoxigenase
LPS	lipopolissacarídeo
LT	leucotrieno
LX	lipoxina
MAC	complexo de ataque à membrana
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
min	minuto
MIP	proteína inflamatória de macrófago
MPO	mieloperoxidase
NF-κB	fator nuclear-κB
NK	<i>natural killer</i>
nNOS	óxido nítrico sintase neural
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	fator de ativação de plaquetas
PAR	receptor ativado por proteases
PARP	polimerase poli-ADP ribose
PBS	tampão fosfato de sódio
PECAM	molécula de adesão plaqueta-endotélio celular
PG	prostaglandina
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGI ₂	prostaciclina
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLC	fosfolipase C
PMN	polimorfonuclear
PSGL	ligante da P-selectina
s.c.	subcutânea
sIL-6R	receptor solúvel da IL-6
SIRS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SP	substância P
TGF	fator de crescimento tumoral
TMB	tetrametilbenzidina
TNF	fator de necrose tumoral
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol acetato
TX	tromboxano
VCAM	molécula de adesão das células vasculares

v.o.

via oral

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resposta inflamatória aguda

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas. Descrições das características clínicas da inflamação foram encontradas em papiros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C., mas o primeiro autor a listar os quatro sinais cardinais da inflamação foi Celsius, um escritor romano do século I d.C., que relatou o aumento no fluxo sanguíneo e a dilatação dos pequenos vasos, *rubor*, a permeabilidade vascular aumentada, *tumor*, que levaria a um aumento na temperatura local, *calor*, à passagem de células do sangue circulante e dor local, *dolor* (ROCHA e SILVA e GARCIA LEME, 2006). A perda de função (*functio laesa*), quinto sinal clínico, foi adicionado posteriormente por Virchow. Em 1793 John Hunter, um cirurgião escocês, observou o que é óbvio para os tempos atuais: que a inflamação não é uma doença, mas uma resposta sem especificidade, com objetivos salutares ao hospedeiro (KUMAR *et al.*, 2005). A doença, vinculada à inflamação, está no desequilíbrio desta resposta.

A descrição moderna da inflamação superficial não difere significativamente da definição formulada por Celsius no primeiro século d.C. Hoje, estudos microscópicos tornaram possível estabelecer que os sinais clínicos da inflamação são resultado da vasodilatação, acúmulo de leucócitos, aumento do líquido intersticial e estimulação dos terminais nervosos por mediadores (ALLER *et al.*, 2007). A inflamação é uma resposta à infecção, antígenos ou lesão tecidual e tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes e potencializar o reparo tecidual (FLOWER e PERRETTI, 2005; NATHAN, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; TRACEY, 2002). A defesa do corpo humano contra hospedeiros compreende barreiras físicas e químicas, como pele e membranas mucosas, assim como a acidez gástrica ou o fluxo secretório e excretório. Agentes que ultrapassam estas barreiras encontram os mecanismos de defesa, as respostas imunes, designados a reconhecer e eliminar materiais estranhos (WALZOG e GAEHTGENS, 2000).

A resposta imune pode ser dividida em respostas inatas e adaptativas; o sistema imune inato é ativado imediatamente após uma infecção,

desencadeando a resposta do hospedeiro ao microorganismo infectante e emitindo um sinal de ativação para a resposta imunológica adaptativa. Eventos como a vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada e infiltração celular são parte da resposta imune inata, e seus componentes celulares primários são os macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK) e neutrófilos. Proteínas efetoras circulantes como o sistema complemento, reagentes de fase aguda e a cascata da coagulação têm importante função na imunidade inata.

A resposta imunológica adaptativa ou específica, só é desencadeada após o reconhecimento do patógeno pela resposta imune inata. Deflagra todo um conjunto de reações singularmente específicas contra o invasor e também torna as ações dos componentes da resposta inata muito mais eficazes. Os linfócitos são os principais componentes celulares da resposta adquirida, sendo divididos em linfócitos B, responsáveis pela resposta humoral, isto é, produção de anticorpos; linfócitos T, que fazem a indução da resposta e são responsáveis pelas reações imunológicas mediadas por células; e as células NK, células linfóides ativas na resposta inata (RANG *et al.*, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Esses mecanismos de resposta imunológica, baseados em funções sofisticadas dos leucócitos, também são responsáveis pela eliminação de células não funcionantes ou lesadas, e assim contribuem para a manutenção da homeostase tecidual. Dessa forma, os mecanismos de defesa não apenas protegem o organismo da infecção, mas também permitem a remoção de restos celulares e de componentes teciduais destruídos, originados por exemplo, de isquemia ou trauma (WALZOG e GAEHTGENS, 2000).

Como parte dessa defesa inata, a resposta inflamatória aguda, iniciada em situações nocivas, biológicas, químicas ou físicas, dá margem ao recrutamento de leucócitos e sua migração rápida e direcionada para regiões-alvo dentro do corpo, o primeiro de quatro pré-requisitos para uma defesa efetiva nos locais de lesão. No segundo passo, os leucócitos desenvolvem instrumentos específicos que são responsáveis pela eliminação de materiais estranhos ou células de tecidos lesados. Estes leucócitos são impedidos de causar lesão tecidual descontrolada, pelos mecanismos de contenção seguidos de formação e, finalmente, resolução da resposta inflamatória aguda. Por fim, a inflamação dá passagem aos processos de reparo e cicatrização que permitem

a recuperação integral da função tecidual, *restitutio ad integrum* (WALZOG e GAEHTGENS, 2000). Entretanto, uma reação inflamatória exacerbada pode levar à lesão tecidual e, se severa, causar descompensação fisiológica, disfunção orgânica e morte (FLOWER e PERRETTI, 2005; NATHAN, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; TRACEY, 2002).

A inflamação pode ser dividida em dois tipos, aguda e crônica, divisão baseada na duração e características patológicas da reação. Artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, asma, silicose e aterosclerose são exemplos de doenças inflamatórias crônicas. Estas desordens são caracterizadas por longa duração (semanas, meses ou anos) com inflamação ativa, destruição tecidual e tentativa de reparo, ocorrendo simultaneamente. Infiltração de células mononucleares e fibrose são características histológicas típicas de inflamação crônica. A inflamação aguda tem, típica ou relativamente, curta duração (horas a dias) e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido rico em proteínas (plasma), migração de células (primariamente neutrófilos) para o sítio lesado e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. Processos patológicos causados pela exacerbção de quadros inflamatórios agudos estão entre os maiores desafios de gerenciamento para anestesiologistas e profissionais de cuidados intensivos. Sepses, traumas severos e grandes cirurgias são exemplos de situações que apresentam os principais componentes inflamatórios agudos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra microorganismos são os anticorpos (defesa humoral) e os leucócitos (defesa celular). Estes são encontrados normalmente na corrente sanguínea, o que justifica a importância atribuída, na inflamação aguda, aos fenômenos vasculares. Em situações de homeostase, normalmente as proteínas plasmáticas e as células circulantes estão contidas no interior dos vasos, em movimento no sentido do fluxo sanguíneo. Diante de um estado inflamatório, os vasos sanguíneos sofrem várias alterações, com o objetivo de facilitar a passagem de proteínas plasmáticas e células sanguíneas da circulação para o local da lesão ou da infecção (KUMAR *et al.*, 2005).

Os sinais da inflamação, incluindo eritema e calor, se desenvolvem rapidamente após a lesão, como resultado da vasodilatação (ALLER *et al.*, 2006; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Uma lesão significativa produz

resposta vasomotora local que, dentre outros objetivos, tende a recuperar a homeostase. Vasoconstrição é um contribuinte primário a esse fim e é iniciada pela liberação de aminas vasoativas, mas células lesadas que secretam prostaglandinas também contribuem para essa diminuição no calibre dos vasos (ALLER *et al.*, 2006).

A vasodilatação segue a vasoconstrição inicial que é revertida 10 a 15 minutos após a lesão. A transição de constrição para dilatação é mediada por diversos fatores, produtos endoteliais por exemplo, e fatores derivados de mastócitos como leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e, particularmente, histamina (HIS) contribuem para a vasodilatação. Ao mesmo tempo, o aumento do calibre do vaso poderia ocorrer com lesão de reperfusão que, por sua vez, causa edema intersticial (ALLER *et al.*, 2006).

O edema, uma característica fundamental da inflamação aguda, é causado pelo aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento transvascular de líquido rico em proteínas de alto peso molecular (exsudato) do compartimento intravascular para o interstício (ALLER *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2005). Resultado das ações de mediadores como HIS, bradicinina (BK), LT, componentes do complemento, substância P (SP) e fator ativador de plaquetas (PAF). Estes fatores alteram intensamente as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas à água e proteínas. Um papel fundamental da mudança na permeabilidade vascular é facilitar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de lesão tecidual (ALLER *et al.*, 2006; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A vasodilatação e a exsudação plasmática são acompanhadas pela marginação de leucócitos, sua adesão e migração (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A migração leucocitária para os sítios de inflamação é crucial para as funções celulares dos leucócitos tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, também foi implicada como uma característica chave em inúmeras doenças inflamatórias como lesão de isquemia-reperfusão, artrite, doença inflamatória intestinal, e a síndrome de disfunção múltipla dos órgãos, associada à sepse e ao trauma (VAN MIERT, 2002). A migração de neutrófilos, monócitos e células *natural killer* (NK) é comumente iniciada em respostas inatas, através da geração local de mediadores inflamatórios, como

quimiocinas e citocinas específicas, seguindo uma lesão inflamatória (NOURSHARGH e MARELLI-BERG, 2005).

A passagem dos leucócitos do compartimento vascular para o tecido extravascular é guiada por interações adesivas específicas entre os leucócitos e as células endoteliais. A sequência de eventos envolvidos nestes processos compõe a teoria do recrutamento leucocitário (figura 1). Envolve marginação e captura dos leucócitos livres circulantes do lúmen vascular; rolagem, ativação, firme adesão e extensão na superfície do endotélio; com subsequente movimento através da barreira das células endoteliais, também chamado de diapedese (NOURSHARGH e MARELLI-BERG, 2005); passo seguido da migração quimiotática dos leucócitos (WAGNER e ROTH, 2000; WALZOG e GAEHTGENS, 2000).

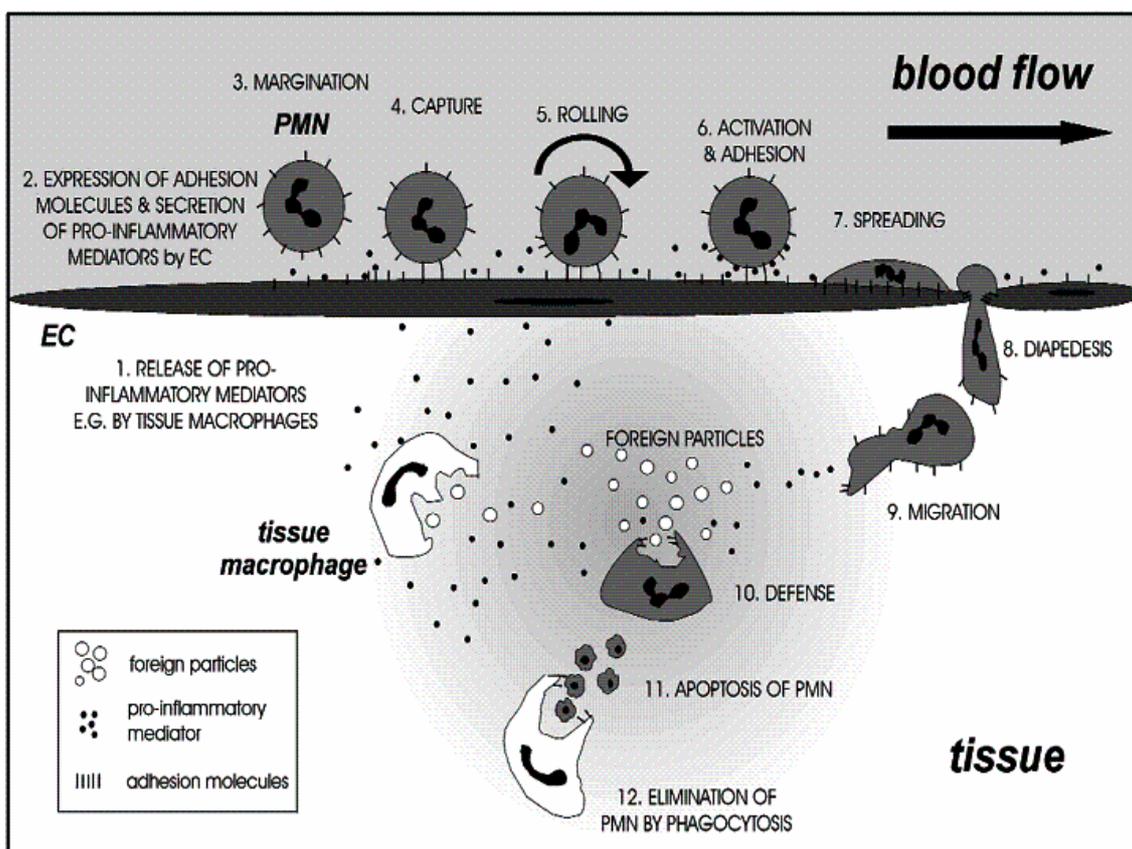


Figura 1: Sequência de eventos envolvidos no recrutamento leucocitário. Sinais liberados por macrófagos teciduais ativam as células do endotélio a expressar moléculas de adesão e a secretar mediadores inflamatórios, levando à captura de leucócitos circulantes, sua rolagem, ativação, adesão, extensão, diapedese transendotelial e migração quimiotática (Adaptado de WALZOG e GAEHTGENS, 2000).

O pré-requisito para todos esses passos, mostrado na figura 1, é a ativação da monocamada de células endoteliais por sinais derivados do tecido. Estes induzem a expressão de moléculas de adesão e a secreção de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais (WAGNER e ROTH, 2000; WALZOG e GAEHTGENS, 2000). O extravasamento de leucócitos para os tecidos é dependente da existência de diferentes famílias de moléculas de adesão e seus respectivos receptores, tanto em leucócitos como em células endoteliais. Os principais grupos de moléculas de adesão são as selectinas, importantes no rolamento; as integrinas, na forte adesão; e a superfamília das moléculas de imunoglobulinas (Ig), como o PECAM-1 ou CD31 (molécula de adesão plaqueta-endotélio celular) imprescindível na transmigração. Os principais receptores de adesão endotelial incluem as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e as moléculas de adesão da célula vascular (VCAM) (KUMAR, *et al.*, 2005; NOURSHARGH e MARELLI-BERG, 2005; VAN MIERT, 2002). A expressão destas moléculas de adesão (E, P, e L-selectinas, ICAM-1), molécula de adesão das células vasculares 1 (VCAM) e integrinas leucocitárias varia conforme os tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória, isto segue a regulação temporal e espacial de populações alvo distintas, para destinos diferentes no corpo (ROBERTS II e MORROW, 2003; WAGNER e ROTH, 2000; WALZOG e GAEHTGENS, 2000).

No caso de polimorfonucleares (PMN), a indução do ligante da L-selectina no endotélio microvascular por mediadores pró-inflamatórios teciduais, dá início à captura e rolagem do PMN via L-selectina. A rolagem também é auxiliada pelo aumento da expressão endotelial de P e E-selectinas, que servem de receptores para seus respectivos ligantes PSGL-1 (ligante da P-selectina) e ESL-1 (ligante da E-selectina). O recrutamento do PMN, subsequente ao rolamento, exige a firme adesão do PMN à célula endotelial mediada por β 2-integrinas, uma família de moléculas de adesão transmembrana expressas na superfície de leucócitos (WALZOG e GAEHTGENS, 2000).

O último objetivo dessas interações é facilitar a migração dos leucócitos do compartimento intravascular para dentro do interstício e do espaço intersticial para os locais de infecção ou lesão (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). O recrutamento das células inflamatórias para os locais da

lesão envolve, além das moléculas de adesão celular descritas, as interações combinadas de vários tipos de mediadores solúveis que parecem desempenhar um papel essencial na coordenação do processo inflamatório (ROBERTS II e MORROW, 2003).

Assim, após o extravasamento os leucócitos se locomovem ao longo de um gradiente químico em direção ao local da lesão, processo denominado quimiotaxia (figura 1). Tanto substâncias endógenas como exógenas podem agir como quimiotáticos, alguns exemplos de substâncias exógenas que funcionam como agentes quimiotáticos são os produtos bacterianos, como os peptídeos N-formilados. Dentre as substâncias endógenas estão os componentes do sistema complemento como o C5a; produtos da via da lipoxigenase (LOX), em especial o leucotrieno B₄ (LTB₄); e as citocinas, principalmente as da família das quimiocinas; ou seja, inúmeros mediadores químicos que se originam de proteínas plasmáticas ou de células (KUMAR *et al.*, 2005; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Uma lesão tecidual ou a presença de bactérias leva a ativação do complemento (NYSTROM, 1998). O sistema complemento consiste em aproximadamente 35 proteínas, que incluem enzimas, cofatores, inibidores ou inativadores e outras proteínas integradas de membrana. Outros componentes são os receptores para os fatores do complemento. A ativação do complemento pode se dar por três vias: uma via denominada clássica, dependente de complexo antígeno-anticorpo; uma via alternativa, independente de anticorpos; e a via da lecitina, onde a lecitina que liga manose, uma colectina plasmática, a qual se liga a componentes da bactérias e vírus, ativando o sistema (KUMAR *et al.*, 2005; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Na inflamação aguda, os componentes com maior importância pertencem ao grupo das anafilatoxinas, o C3a, C4a e C5a; são pequenos fragmentos da clivagem dos componentes do grupo C por serinas proteases convertases durante a cascata de ativação. Dentre as anafilatoxinas, o fragmento C5a é o melhor caracterizado, sendo um potente mediador da inflamação local e sistêmica. Suas atividades biológicas são mediadas pela interação com seu receptor C5aR, levando a atração e agregação neutrofílica, quimiotaxia, atividade citotóxica e liberação de metabólitos reativos do oxigênio e de proteases de eosinófilos, monócitos e neutrófilos. O C5a também aumenta

a expressão de moléculas de adesão como E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (ARUMUGAM, *et al.*, 2006; KUMAR, *et al.*, 2005).

Outras ações do complemento são a função de opsoninas do fragmento C3b e seu produto de clivagem iC3b, ao facilitar a fagocitose por neutrófilos e macrófagos; e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) pela interação dos fragmentos C5b, C6, C7, C8 e C9 (C5b-9) que, em células do organismo, ativa fosfolipases e estimula uma variedade de atividades celulares, incluindo a síntese de prostanoídes, LT e citocinas. Enquanto que, preferencialmente em células de agentes agressores, o MAC forma um canal na membrana lipídica que permite a entrada de líquidos e íons, causando lesão celular (ARUMUGAM *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2005; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A ativação do complemento também induz macrófagos teciduais, monócitos e outros elementos celulares reativos, como mastócitos, células endoteliais e plaquetas a secretar mediadores como as aminas vasoativas, HIS e serotonina e peptídeos vasoativos, como a BK (KUMAR *et al.*, 2005; NYSTROM, 1998).

Histamina e serotonina são mediadores pré-formados, armazenados em grânulos celulares, e estão entre os primeiros a serem liberados durante a inflamação (KUMAR *et al.*, 2005). São responsáveis pela vasoconstrição inicial e, juntamente com outros mediadores, pela vasodilatação subsequente e aumento da permeabilidade vascular (ALLER *et al.*, 2006; GUZIK *et al.*, 2003; NATHAN, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A principal fonte de HIS do organismo são os mastócitos teciduais (COUSSENS e WERB, 2002; DRAY, 1995; GUZIK *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005; NATHAN, 2002) e este mediador pode levar à ativação de outras células como as células endoteliais, levando à expressão de moléculas de adesão (WALZOG e GAEHTGENS, 2000). A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), possui ações semelhantes às da HIS e está presente nas plaquetas e células enterocromafins (KUMAR *et al.*, 2005). As aminas vasoativas também estão entre os mediadores responsáveis pela sensação de dor na inflamação, através de sua ação sobre os neurônios sensoriais (DRAY, 1995).

Peptídeos vasoativos são gerados pelo sistema das cininas, através da ação de proteases específicas, as calicreínas, sobre proteínas plasmáticas chamadas cininogênios. A cascata que produz as cininas, cujo principal

representante é o nonapeptídeo BK, é desencadeada pela ativação do fator XII da via intrínseca da coagulação (fator de Hageman) quando entra em contato com superfícies carregadas negativamente, como o colágeno e as membranas basais (KUMAR *et al.*, 2005). As cininas exercem inúmeros efeitos pró-inflamatórios, incluindo liberação de prostanóides, citocinas e radicais livres de vários tipos celulares. Elas afetam o calibre dos vasos sanguíneos através da estimulação de neurônios pós-ganglionares simpáticos (DATTI *et al.*, 2002; DRAY, 1995). Cininas liberam HIS e outros mediadores pela degranulação de mastócitos e também causam extravasamento plasmático pela contração das células endoteliais (ALLER *et al.*, 2006; DRAY, 1995; GUZIK *et al.*, 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). São potentes algógenos, induzindo dor pela estimulação direta dos nociceptores da pele, articulações e músculos, assim como por sua sensibilização ao calor e estímulos térmicos (DRAY, 1995; RICHARDSON e VASKO, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). Há um forte sinergismo entre a BK e outras substâncias algogênicas como PG e 5-HT (BURIAN e GEISLINGER, 2005; DRAY, 1995; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). A própria caliceína contribui para a resposta inflamatória com sua ação quimiotática e por converter o fator C5 do complemento diretamente no produto quimiotático C5a (KUMAR *et al.*, 2005).

Linfócitos e macrófagos ativados, assim como outros tipos celulares como células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo, também produzem polipeptídeos ou glicoproteínas que modulam a função de outros tipos celulares, conhecidas como citocinas (ALWANI *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2005). As citocinas têm um importante papel regulador sobre o início, a manutenção e o término das reações inflamatórias. Mais de cinquenta foram identificadas e cada vez mais tem se descoberto sobre seus receptores e vias de sinalização. A formação e a secreção de fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-1 β , citocinas pró-inflamatórias, são suficientes para induzir a cascata de citocinas pró-inflamatórias secundárias e outros tipos de mediadores, como fator de ativação plaquetária, PG, LT, tromboxanos (TX) e óxido nítrico (NO) (WITKAMP e MONSHOUWER, 2000).

Esta família de mediadores inclui as interleucinas (IL), interferons (INF), fator de crescimento tumoral- β (TGF- β), fatores de necrose tumoral (TNF) e as quimiocinas. Enquanto algumas destas citocinas, como o TGF- β , o antagonista

do receptor da IL-1 (IL1-Ra) e alguns membros da IL-10 possuem funções antiinflamatórias, a maioria exerce efeitos pró-inflamatórios, através da ação em receptores específicos de citocinas em células-alvo. Entre as citocinas mais conhecidas, TNF- α , IL-1 β e IL-6 são vistas como as mais importantes, devido aos seus papéis na patofisiologia de muitas respostas inflamatórias assim como no choque séptico (ALWANI *et al.*, 2006).

Com a ativação leucocitária, o TNF- α e a IL-1 são secretados em grandes quantidades principalmente pelos macrófagos e aparecem na circulação em uma hora. Eles têm tanto efeitos locais como sistêmicos. Acredita-se que o TNF- α , anteriormente conhecido como caquetina, seja o responsável pela caquexia ou emagrecimento observado em doenças inflamatórias crônicas e câncer (ALWANI *et al.*, 2006; WAGNER e ROTH, 2000).

O TNF- α pertence à superfamília TNF, que possui mais de dezenove ligantes. É produzido principalmente por fagócitos mononucleares, mas pode ser produzido por outras células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, células NK, e mastócitos) ou não inflamatórias (endotélio). É produzido em resposta a muitos estímulos extracelulares como outras citocinas, choque térmico, isquemia/reperfusão, luz UV e infecções microbianas. A ação destes estímulos é transmitida intracelularmente através dos membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que levam à síntese de TNF, dentre outras citocinas (ALWANI *et al.*, 2006). O TNF- α exerce potentes efeitos inflamatórios: induz a expressão endotelial de ICAM-1 e VCAM-1 (ALWANI *et al.*, 2006; CUZZOCREA, 2005; KUMAR *et al.*, 2005; LAMPINEM *et al.*, 2004); é um potente ativador de neutrófilos e fagócitos mononucleares; serve como fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004); aumenta a permeabilidade vascular; promove a liberação do fator nuclear-kB (NF-kB) no citosol, ao estimular a degradação da subunidade inibitória I κ B. O NF-kB regula a síntese de muitas proteínas que funcionam em vias inflamatórias, incluindo IL, INF- β , TNF- α e ciclooxigenases (COX) (ALWANI *et al.*, 2006; BURIAN e GEISLINGER, 2005; KUMAR *et al.*, 2005; WITKAMP e MONSHOUWER, 2000). A liberação sistêmica de TNF- α pode, entretanto, precipitar uma cascata destrutiva de eventos que podem resultar em lesão tecidual, disfunção orgânica e, potencialmente, morte. Entre seus

efeitos sistêmicos está a indução de febre, estimulação da secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativação da cascata de coagulação, supressão miocárdica, indução de vasodilatadores sistêmicos com conseqüente hipotensão, catabolismo e hipoglicemia (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A IL-1, conhecida por vários nomes nos últimos 40 anos, é um potente mediador da inflamação e febre (WAGNER e ROTH, 2000). Os quatro membros da família da IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra e IL-18) são produzidos de forma semelhante ao TNF- α (ALWANI *et al.*, 2006) e, freqüentemente, são encontrados juntos em inúmeros cenários inflamatórios (WAGNER e ROTH, 2000). Seus efeitos fisiológicos são, essencialmente, idênticos aos do TNF- α (ALWANI *et al.*, 2006; WAGNER e ROTH, 2000; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004), entretanto, a IL-1 não induz, por si só, lesão tecidual ou morte apoptótica, embora possa intensificar os efeitos lesivos do TNF- α (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A secreção das citocinas TNF- α e IL-1, mesmo que transitória, é suficiente para induzir, dentre outros mediadores, uma cascata de citocinas pró-inflamatórias secundárias, incluindo IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e proteína inflamatória de macrófago-1 (MIP-1 α/β) (VAN MIERT, 2002; WITKAMP e MONSHOUWER, 2000).

A IL-6 secretada na circulação também possui efeitos sistêmicos. Macrófagos, células endoteliais e fibroblastos secretam esse polipeptídeo, que exhibe muitas das ações inflamatórias da IL-1 β e do TNF- α (ALWANI *et al.*, 2006; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A IL-6 é o principal sinal para a resposta de fase aguda hepática e serve como fator de crescimento para linfócitos B (ALWANI *et al.*, 2006; GUZIK *et al.*, 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Entretanto, enquanto o TNF- α e a IL-1 β induzem a produção de IL-6, esta última inibe a síntese dos primeiros, produzindo desta forma, um efeito antiinflamatório através de *feedback* negativo; além disso, a IL-6 estimula a síntese de IL-1Ra (ALWANI *et al.*, 2006). O IL-1Ra pertence ao grupo de antagonistas de citocinas proinflamatórias que ocorrem naturalmente. Como seu próprio nome já diz, o IL-1Ra liga-se ao receptor de IL-1, mas não induz sua ativação. Estas proteínas parecem atuar como inibidores

competitivos da ação da IL-1, exercendo efeitos antiinflamatórios (ALWANI *et al.*, 2006; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; WATERER e WUNDERINK, 2003).

Como descrito, as principais citocinas proinflamatórias causam febre e estimulam a hipófise a liberar hormônios do estresse. Elas também estimulam o fígado a sintetizar inúmeras proteínas de fase aguda como proteína C-reativa, fibrinogênio e importantes antiproteases (NYSTROM, 1998).

Além dos eventos descritos, a ativação celular por trauma mecânico, citocinas e fatores de crescimento, dentre outros estímulos, leva à rápida remodelação dos lipídios de membrana para gerar mediadores lipídicos biologicamente ativos. Estes funcionam como sinais intracelulares ou extracelulares que afetam diversos processos biológicos, incluindo a inflamação e a homeostasia (BURIAN e GEISLINGER, 2005; KUMAR *et al.*, 2005). Esses mediadores são os hormônios de curto alcance ou autacóides, formados rapidamente, que exercem seus efeitos no local, degradando-se espontaneamente ou sendo destruídos por enzimas (KUMAR *et al.*, 2005). Dos fosfolipídeos de membrana derivam duas famílias distintas de autacóides: os eicosanóides, formados a partir de alguns ácidos graxos poliinsaturados, principalmente o ácido araquidônico (AA), que incluem as PG, os TX e os LT; e fosfolipídeos modificados cujo principal representante é o PAF (MORROW e ROBERTS II, 2003).

O AA, um ácido graxo poliinsaturado derivado da dieta ou da conversão do ácido graxo essencial ácido linolêico, é clivado dos fosfolipídeos de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) e da fosfolipase C (PLC) (KUMAR *et al.*, 2005; RICHARDSON e VASKO, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). Duas classes principais de enzimas são responsáveis pela síntese dos metabólitos do AA, também chamados de eicosanóides: as ciclooxigenases sintetizam as PG e os TX; e as lipoxigenases produzem os LT e as lipoxinas (LX) (ALWANI *et al.*, 2006; DRAY, 1995; KUMAR *et al.*, 2005; WAGNER e ROTH, 2000).

A enzima ciclooxigenase (COX), também chamada de PG endoperóxido sintase, prostaglandina H sintase (PGHS) ou ácido graxo ciclooxigenase, possui duas isoformas identificadas: COX-1 e COX-2. A primeira apresenta-se de forma constitutiva na maioria dos tecidos corpóreos, enquanto a segunda,

embora também se manifeste constitutivamente, é produzida com maior intensidade em estados patológicos (BURIAN e GEISLINGER, 2005; PACHER *et al.*, 2007; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). Recentemente observou-se que a família de proteínas da COX-1 é formada por pelo menos, quatro variações de RNAm derivadas do gene da COX-1. Estas variantes são: a própria COX-1; duas seqüências parciais pCOX-1, a seqüência pCOX-1a e pCOX-1b; e a COX-3. Com exceção da COX-1, essa é a única variação que sofre transcrição. A COX-3 possui atividade de COX em cães; em humanos e roedores, o RNAm COX-3 codifica proteínas com seqüências de aminoácidos diferentes das produzidas pela COX-1 ou 2, e sem atividade de COX. Sua expressão parece seguir os padrões constitutivos da COX-1, mas suas funções permanecem sob questionamento (BURIAN e GEISLINGER, 2005; KIS *et al.*, 2005; WARNER e MITCHEL, 2002).

As ciclooxigenases transformam o AA em PGG₂ e esta em PGH₂ (BURIAN e GEISLINGER, 2005; PACHER *et al.*, 2007; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). A formação subsequente das PG finais, a partir da PGH₂, depende da presença de sintases específicas que produzem os prostanóides funcionalmente importantes PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂ (prostaciclina) e TXA₂. Estas PG podem sair da célula por transporte facilitado pelos transportadores de prostaglandinas (PGT) e outros carreadores, exercendo suas ações autócrinas ou parácrinas em uma família de receptores próprios, localizados nas membranas celulares. São eles: EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ (EP₁₋₄), para a ligação da PGE₂; DP₁₋₂, para a PGD₂; receptor FP, para a PGF₂; IP para a PGI₂; e TPa e TPh, para o TXA₂ (BURIAN e GEISLINGER, 2005).

As PG e os TX medeiam importantes ações da resposta inflamatória, como a vasoconstrição inicial, que se dá pela ação do TXA₂, dentre outros mediadores (ALLER *et al.*, 2006; PACHER *et al.*, 2007); a transição da vasoconstrição para a vasodilatação tem a participação das PG vasodilatadoras PGI₂ (prostaciclina), PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α} (ALLER *et al.*, 2006; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004); TXA₂ é também potente agregador plaquetário, podendo levar à trombose tecidual (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004); as PG são potentes agentes sensibilizantes, capazes de modular múltiplos sítios da via nociceptiva (BURIAN e GEISLINGER, 2005): PGE₂ e PGI₂ aumentam a liberação de peptídeos como

SP e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) na inflamação neurogênica, agem sinergicamente com a BK na indução de dor e estão entre os mais importantes mediadores de hiperalgesia inflamatória (DRAY, 1995; RICHARDSON e VASKO, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). A PGD_2 é o principal produto catalisado pela COX em inúmeros tecidos e células como mastócitos, plaquetas, linfócitos T, células dendríticas e macrófagos. A PGD_2 está envolvida em muitos processos biológicos, como na inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso vascular e não vascular, assim como na regulação da vigília e na cronicidade da resposta inflamatória (GILROY *et al.*, 2004).

As lipooxigenases (LOX) formam uma família de enzimas citosólicas cujos produtos iniciais derivados do AA, são gerados por 3 enzimas que só estão presentes em alguns tipos de células, esses metabólitos são denominados ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE). Assim as plaquetas possuem apenas a 12-LOX e sintetizam o 12-HPETE, e os leucócitos têm tanto a 12-LOX, como a 5-LOX, e sintetizam o 12-HPETE e o 5-HPETE, que é quimiotático para neutrófilos. Os HPETE, semelhante às PGG e PGH, são intermediários instáveis que sofrem metabolização enzimática (KUMAR *et al.*, 2005; MORROW e ROBERTS II, 2003).

A 5-LOX, enzima predominante dos neutrófilos tem grande importância na via das LOX, visto que seu principal produto, o 5-HETE, é convertido em uma família de compostos chamados leucotrienos (ALWANI *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2005). Os LT, assim como as PG, têm ação vasodilatadora e edematogênica (ALLER *et al.*, 2006; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Em especial os cisteinil-leucotrienos, LTC_4 , D_4 e E_4 , causam intensa vasoconstrição e broncoespasmo e constituem o material originalmente conhecido como “substância de reação lenta da anafilaxia” (GUZIK *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005; MORROW e ROBERTS II, 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Os LT, em especial o LTB_4 , também ativam as respostas dos neutrófilos, como agregação e adesão ao endotélio venular, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisossomais (KUMAR *et al.*, 2005; NATHAN, 2002), além da potente atividade quimiotática (KUMAR *et al.*, 2005; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). O LTB_4 também diminui os limiares nociceptivos, causando hiperalgesia térmica e

mecânica na inflamação neurogênica, pela produção de 8R,15S-diHETE em leucócitos PMN (DRAY, 1995).

As ações pró-inflamatórias de inúmeras PG e LT são contidas/reguladas, por uma classe de moléculas chamadas lipoxinas (LX). As LX são uma classe de eicosanóides oxidados que se ligam a receptores celulares e bloqueiam o influxo de neutrófilos (NATHAN, 2002). Estas moléculas são geradas pela ação combinada de leucócitos, principalmente neutrófilos, e plaquetas (DYKE e SERHAN, 2003; GILROY *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

Outro mediador bioativo derivado dos fosfolipídeos é o PAF. O PAF é um fosfoglicerídeo acetilado derivado dos lipídeos das membranas celulares e é produzido pelas células endoteliais, plaquetas, PMN e macrófagos. Promove tanto processos pró-inflamatórios como pró-adesivos (KUMAR *et al.*, 2005; WAGNER e ROTH, 2000). Durante quadros de sepse e pneumonia bacteriana, o PAF é necessário para uma resposta máxima dos PMN. Além da estimulação das plaquetas, causa vaso e broncoconstrição, e em doses extremamente baixas, estimula uma potente vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (ALLER *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2005; NATHAN, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; WAGNER e ROTH, 2000). Também é capaz de estimular a quimiotaxia (COUSSENS e WERB, 2002; KUMAR *et al.*, 2005), a degranulação e a produção de espécies reativas de oxigênio. O PAF pode ser importante ao mediar o processo de adesão, por exemplo, quando derivado de células endoteliais pode estar localizado em sua superfície, onde tem acesso aos receptores de PAF nos PMN em rolamento. Além disso, o PAF ainda aumenta a síntese de outros mediadores pelos leucócitos e outras células, especialmente os eicosanóides (KUMAR *et al.*, 2005; WAGNER e ROTH, 2000).

A cascata da coagulação é ativada durante a lesão tecidual e infecção. É dividida em duas vias que convergem e levam à ativação de trombina, com subsequente quebra do fibrinogênio em fibrina. A via intrínseca consiste numa série de proteínas plasmáticas ativadas pelo fator de Hageman (fator XIIa), uma proteína hepática que é ativada pela ligação ao colágeno, membrana basal ou plaquetas ativadas. A ativação do fator de Hageman dispara a ativação da cascata de proteínas, resultando na formação de trombina. A via

intrínseca é mais comumente ativada por trauma tecidual direto (KUMAR *et al.*, 2005; MAJERUS e TOLLEFSEN, 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Em contraste, a via extrínseca é iniciada pela produção do fator tecidual (tromboplastina). Recentes estudos indicam que a via extrínseca é a via primária de ativação durante infecção e inflamação sistêmica, particularmente sepse e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). O fator tecidual é expresso em superfícies teciduais que não são normalmente expostas ao compartimento vascular, como os tecidos subcutâneos e as camadas adventícias dos vasos sanguíneos. Além disso, células endoteliais e monócitos ativados produzem fator tecidual em estados inflamatórios, em resposta ao TNF- α , IL-1, IL-6 e proteína C-reativa. A presença do fator tecidual causa a ativação do fator VII, formando um complexo, que causa a liberação de trombina pela ativação de uma série de fatores da coagulação (MAJERUS e TOLLEFSEN, 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A ativação da cascata de coagulação não é importante apenas pela formação de fibrina, mas possui importantes efeitos na resposta inflamatória. A trombina é o principal elo entre o sistema de coagulação e a inflamação. Ela se liga aos seus receptores PAR (receptores ativados por proteases) tipo 1, o que leva à mobilização da P-selectina, produção de quimiocinas e expressão de moléculas de adesão endotelial para os leucócitos; indução de COX-2 e produção de PG; produção de PAF e NO; e alterações no formato do endotélio (KUMAR *et al.*, 2005; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A trombina e o complexo fator tecidual-VIIa podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , assim a inflamação aguda ativa a cascata de coagulação, que intensifica a resposta inflamatória (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A infiltração intersticial de células também é favorecida por ações de componentes intrínsecos e extrínsecos das cascatas de coagulação. A fibrina forma uma matriz precoce combinando-se com a vibronectina e fibronectina, que facilita a migração transvascular, primeiro de plaquetas e depois de leucócitos (ALLER *et al.*, 2006).

Outro importante mediador da resposta inflamatória é o NO. Um mediador pleiotrópico da inflamação, primeiramente chamado de fator de relaxamento derivado do endotélio, é um gás solúvel produzido pelas células

endoteliais, macrófagos e alguns neurônios cerebrais. Desempenha papel importante nos componentes vasculares e celulares da resposta inflamatória (KUMAR *et al.*, 2005). O NO é produzido a partir da L-arginina pela ação da NO sintase (NOS). Três isoformas da NOS foram identificadas: as NOS endotelial (eNOS) e neural (nNOS) são produzidas de forma constitutiva e sua expressão aumenta com o fluxo de cálcio enquanto leucócitos ativados produzem a NOS induzida (iNOS) após a exposição a produtos microbianos ou citocinas pró-inflamatórias (DRAY, 1995; KUMAR *et al.*, 2005; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Muitas linhas de evidência, acumuladas nos últimos 15 anos, indicam que o aumento na produção de NO, devido a indução da expressão de iNOS por citocinas inflamatórias, é instrumento da patofisiologia da inflamação (PACHER *et al.*, 2007). Por sua ação no músculo liso vascular, é um potente vasodilatador e reduz a agregação e adesão plaquetárias. Em condições normais, sua produção reduz o recrutamento leucocitário, enquanto a diminuição de seus níveis promove o rolamento e a adesão leucocitária. (GUZIK *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005). Também promove sensibilização dolorosa (GUZIK *et al.*, 2003; RICHARDSON e VASKO, 2002).

O NO e seus derivados são microbicidas, de forma que este também demonstra ser um mediador na defesa do hospedeiro contra infecções (GUZIK *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005). Mediadores pró-inflamatórios ativam células inflamatórias e enzimas como a iNOS, que produz grandes quantidades de NO e de enzimas NADPH oxidase e a xantina oxidase, produtoras de espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A produção simultânea de NO e $O_2^{\cdot-}$ resulta na geração de peroxinitrito ($ONOO^-$) que, por sua vez, lesiona moléculas alvo como proteínas, glutathiona (GSH), mitocôndrias e DNA (DYKE e SERHAN, 2003; PACHER *et al.*, 2007). A lesão do DNA pode iniciar a morte apoptótica, que é o gatilho para ativação da polimerase poli ADP-ribose (PARP), que pode induzir necrose celular pela depleção de ATP. Tanto o peroxinitrito como o PARP, contribuem para a intensificação das vias de transdução do sinal inflamatório, produzindo, desta forma, um ciclo de auto-amplificação da lesão celular inflamatória (PACHER *et al.*, 2007). Ânions superóxido são convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase. Além disso, PMN também contém a enzima mieloperoxidase (MPO) em seus grânulos azurofílicos (DYKE e SERHAN, 2003; KUMAR *et al.*, 2005).

MPO catalisa a conversão de H_2O_2 em ácido hipocloroso. Este é considerado o primeiro produto responsável pela citotoxicidade dos neutrófilos, evidente quando a enzima é liberada fora do vacúolo lisossômico (DYKE e SERHAN, 2003; PACHER *et al.*, 2007). Esta citotoxicidade é proveniente da produção de poderosas cloroaminas oxidantes. Somado ao seu ataque oxidativo direto, os radicais de oxigênio também podem modular várias atividades celulares, importantes mediadores na sequência de eventos que leva à lesão tecidual. Radicais superóxido inativam o NO, mediador endotelial do relaxamento vascular, enquanto o H_2O_2 é indutor da aderência de neutrófilos a vasos sanguíneos intactos. A exposição aos radicais pode estimular a produção de PAF pelas células endoteliais e reduzir seu catabolismo; pode induzir a geração de substâncias plasmáticas quimiotáticas para neutrófilos, e também a síntese e exposição endotelial de fator tecidual, promovendo trombose intravascular (DYKE e SERHAN, 2003).

A resposta inflamatória de fase aguda envolve mecanismos adicionais que tem a função de conter e reverter a resposta inflamatória. Neste processo há a participação coordenada de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Uma função imunossupressora também foi atribuída à epinefrina, acetilcolina, cortisol, glucagon e adenosina. Neutrófilos entram em apoptose e há a captação das células apoptóticas pelos macrófagos, resultando numa diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-8, e no aumento da produção de citocinas antiinflamatórias, como o TGF- β , IL-10, e IL-4, que por sua vez, podem inibir a produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 pelos monócitos/macrófagos. A resposta de fase aguda também produz inibidores de TNF e IL-1, que se ligam às citocinas circulantes ou bloqueiam os receptores nas células-alvo. A associação da resposta imunossupressora com a ação antimicrobiana favorece a fase final da inflamação (ALLER *et al.*, 2006; NYSTROM, 1998).

Um evento bem descrito na transição para a resolução é a substituição de PMN por monócitos e macrófagos fagocíticos. Entretanto, o que se sabe até o momento sobre os sinais que controlam esse perfil de troca celular é incerto. Estudos analisando a infiltração leucocitária na inflamação peritoneal sugerem que a interação entre a IL-6 e seu receptor solúvel, sIL-6R, forma um dos principais determinantes desta troca de PMN para monócitos. Foi mostrado que

o sIL-6R, produzido pelos PMN infiltrados, forma um complexo com a IL-6 que modula diretamente a expressão de quimiocinas CC e CXC. Assim, a síntese de quimiocinas CXC, induzida pela IL-1 e pelo TNF- α , é suprimida, enquanto a quimiocina quimioatratadora de monócitos CC1 é promovida. Esta troca de quimiocinas inibe o recrutamento de neutrófilos em favor de um influxo sustentado de células mononucleares. Somado às quimiocinas, os eicosanóides também orquestram a transição precoce para a resolução da inflamação aguda. O metabolismo transcelular do AA pela interação das vias da LOX origina a família LX. Conforme descrito, LX têm ações seletivas sobre leucócitos que incluem inibição da quimiotaxia de PMN, sua adesão e transmigração através das células endoteliais, assim como inibição do aumento no exsudato vascular mediado pelos PMN. Não está clara a existência de um *crosstalk* entre as LX e o complexo sinalizador IL-6/sIL-6R no controle do perfil de troca leucocitária. Todavia, parece que quando a inflamação aguda necessita de resolução, o complexo IL-6/sIL-6R, as quimiocinas e as LX representam alguns dos primeiros sinais que controlam a troca de PMN precoces para monócitos/macrófagos (GILROY, 2003).

Muitas variáveis podem modificar o processo inflamatório básico, como a natureza e a intensidade da lesão, o local e o tecido afetado, e a responsividade do hospedeiro. Entretanto, a inflamação aguda, geralmente evolui para um destes três resultados finais: resolução completa, estado ideal; cicatrização pela substituição de tecido conjuntivo (fibrose); progressão da resposta tecidual, a cronicidade da resposta (GILROY, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

1.2 Terapia antiinflamatória

A homeostasia e o estado saudável são restabelecidos quando a inflamação é limitada por respostas antiinflamatórias, intrínsecas ao organismo, que são redundantes, rápidas, reversíveis, localizadas, adaptativas a mudanças na origem e integradas ao sistema nervoso (TRACEY, 2002; NATHAN, 2002). Quando as forças de contenção intrínsecas falham ou não são suficientes faz-se uso de auxiliares extrínsecos, substâncias que quando

administradas ao organismo possuem ação antiinflamatória e atuam na recuperação da homeostasia corpórea.

Dentre as principais terapias antiinflamatórias, os antiinflamatórios não esteroidais (AINE) têm a aplicação mais ampla. Os AINE atualmente disponíveis agem, em sua maioria, inibindo a atividade das isoformas 1 e 2 da enzima COX, inibindo assim, a síntese de PG e TX (BURIAN e GEISLINGER, 2005; ROBERTS II e MORROW, 2003). Exemplos de AINE incluem o ácido acetil salicílico, protótipo da classe introduzido na medicina em 1899, que acetila irreversivelmente a COX; e vários outros tipos de ácidos orgânicos, como o ibuprofeno, derivado do ácido propiônico; indometacina, da classe dos derivados do ácido acético; e os ácidos enólicos, como o piroxicam. Sendo que todos estes derivados de ácidos competem com o AA pelo local ativo da COX (ROBERTS II e MORROW, 2003).

O fato de que a isoforma 1 da COX é a forma mais presente constitutivamente, leva a crer que a sua inibição pelos AINE não seletivos seja a base dos efeitos colaterais graves observados com esses inibidores, principalmente sobre o trato gastrointestinal. Por outro lado, a inibição seletiva da COX-2 está envolvida na estratégia terapêutica de escolha para o tratamento de condições inflamatórias (ALWANI *et al.*, 2006). A COX-2 possui um canal para a entrada do substrato, mais largo que a COX-1, desta forma, agentes seletivos para a COX-2 normalmente são maiores que os não seletivos, grandes o suficiente para não conseguirem entrar pelo canal da COX-1 e impedir a entrada do AA (HAWKEY, 2001; RANG *et al.*, 2004). A expressão da COX-2 é induzida por estimulantes inflamatórios como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram negativas (LPS), citocinas proinflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e fatores de crescimento; enquanto sua expressão é inibida por glicocorticóides e citocinas antiinflamatórias (ALWANI *et al.*, 2006). O rofecoxib e o celecoxib, fármacos da classe designada coxibs, são exemplos de inibidores seletivos da COX-2 (HAWKEY, 2001; RANG *et al.*, 2004)

Interferir com a habilidade das células inflamatórias se aderirem e migrarem através do endotélio durante certos estados patológicos pode ser benéfico. Desta forma, um dos melhores efeitos do tratamento com

glicocorticóides e AINE, é limitar a ativação e o recrutamento de leucócitos (WAGNER e ROTH, 2000).

Glicocorticóides são mediadores antiinflamatórios endógenos potentes, liberados em minutos em resposta ao estresse e à lesão tecidual para controlar a severidade da resposta inflamatória, funcionando como freios internos contra reações inflamatórias potencialmente exageradas produzidas pelo hospedeiro. A remoção deste potente e primário mecanismo de controle está associada à inflamação prolongada e exacerbada, incluindo, em alguns casos, a letalidade. Glicocorticóides sintéticos agem da mesma forma que mediadores endógenos. Sua ação se dá através de receptores nucleares (GR), localizados sob a forma inativa no citoplasma. A ligação do glicocorticóide ao receptor o ativa e o complexo glicocorticóide-GR dirige-se para o núcleo, onde reage, na forma de dímeros, com os elementos responsivos aos glicocorticóides (GRE), que são seqüências específicas de DNA dentro das regiões reguladoras dos genes afetados, esta ligação leva à ativação ou à inibição da transcrição de genes-alvo. Além da interação receptor-DNA, os glicocorticóides também parecem exercer sua ação através de interações receptor-proteína, onde esta proteína consiste em importantes fatores de transcrição, como o NF- κ B e o AP-1, que regulam a expressão de diversos componentes do sistema imune. Dessa forma, há a inibição da produção de mediadores inflamatórios pelos leucócitos, bem como das respostas das células-alvo a estes mediadores (GILROY *et al.*, 2004; SCHIMMER e PARKER, 2003; WAGNER e ROTH, 2000).

No processo inflamatório há uma linha tênue entre os efeitos benéficos da inflamação e a possibilidade do processo causar e agravar uma lesão tecidual, levando a apoptose e necrose (ALLER *et al.*, 2006). A magnitude da resposta inflamatória é crucial; uma vez que respostas insuficientes resultam em imunodeficiência, que pode levar a infecções e câncer; e respostas excessivas causam morbidade e mortalidade em doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide (AR), doença de Crohn, aterosclerose, diabetes, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e isquemia cerebral e do miocárdio. Há situações em que a resposta inflamatória atinge a circulação sanguínea, como ocorre no choque séptico, meningite e trauma severo. Nestes casos a inflamação pode apresentar mais riscos ao organismo hospedeiro do que o estímulo original (TRACEY, 2002).

A evolução da resposta inflamatória aguda para crônica existe quando a inflamação com destruição tecidual ocorre por um período prolongado, de maneira excessiva e sem resolução (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Doenças reumáticas, como osteoartrite e AR, são importantes causas de deficiência nos países ocidentais e têm como sintomas prevalentes inflamação, dor, destruição articular, deformações e o prejuízo da função locomotora com variáveis graus de incapacitação. As alterações articulares apresentam também, proliferação da membrana sinovial e erosão da cartilagem e osso. Sua etiologia permanece desconhecida, provavelmente representam uma reação auto-imune, e as citocinas inflamatórias primárias, IL-1 e TNF- α , desempenham um importante papel na patogenia (BERTOLINI, 2001; HENDERSON, 2003; RANG *et al.*, 2004).

A atual farmacoterapia das doenças reumatóides consiste no tratamento com AINE, que promovem a redução dos sintomas, mas não retardam a evolução da doença; agentes anti-reumatóides modificadores da doença (ARMD), grupo que abrange uma variedade de fármacos com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação, como o metotrexato, antagonista do ácido fólico com ação citotóxica e imunossupressora; a sulfassalazina, que parece atuar pela remoção dos metabólitos tóxicos do oxigênio produzidos pelos neutrófilos, produz remissão da AR ativa e é usada também no tratamento da doença intestinal inflamatória crônica; compostos de ouro, como a auranofina, que inibe a indução de IL-1 e TNF- α ; penicilamina, que acredita-se, modifica a doença reumatóide por diminuir a produção de IL-1 e/ou pelo impedimento da maturação do colágeno recém sintetizado; e a cloroquina, antimalárico usado também no tratamento do lupus eritematoso. O tratamento pode incluir ainda, agentes imunossupressores, como a azatioprina e a ciclosporina, que atuam na fase de indução, reduzindo a proliferação de linfócitos, mas alguns imunossupressores também inibem a fase efetora, onde há a ação celular ou humoral da resposta imunológica. Os glicocorticóides também são usados no tratamento; e mais recentemente, as substâncias anticitocinas (infliximab, etanercept), que estão direcionando o tratamento para aspectos específicos dos processos lesivos da AR, ambos os exemplos citados ligam-se ao TNF e inibem seus efeitos (RANG *et al.*, 2004).

Recentes progressos na determinação dos processos patofisiológicos envolvidos nessas doenças, especialmente com relação ao papel das citocinas, têm resultado em novas abordagens terapêuticas, entretanto, nenhum dos tratamentos existentes oferece cura ou terapia definitiva (BERTOLINI, 2001).

Doenças inflamatórias intestinais como Doença de Crohn e colite ulcerativa, também têm se sobressaído nos últimos anos como importantes problemas de saúde do ocidente. Doenças inflamatórias intestinais são desordens multifatoriais de etiologia desconhecida. Substantial progresso tem ocorrido na caracterização das populações de células imunes e mediadores inflamatórios envolvidos, tanto em pacientes quanto em modelos murinos, e há importantes evidências da contribuição das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como do desequilíbrio entre células T reguladoras e células T proinflamatórias, na patofisiologia destas doenças (BONDER e KUBES, 2003; CUZZOCREA, 2005). Exemplos são os monócitos de pacientes com doença de Crohn, e PMN de indivíduos com colite ulcerativa, que possuem uma capacidade aumentada de gerar radicais livres de oxigênio (CUZZOCREA, 2005). De fato pacientes com doença de Crohn, possuem uma superprodução de citocinas Th1, como IFN- γ , TNF- α , e IL-12, de células T CD4⁺, implicadas no desenvolvimento da doença, e a terapia anti-TNF α é um dos tratamentos mais efetivos até o momento. Por outro lado, a melhora no quadro de colite ulcerativa com anticorpos contra citocinas Th2, como a IL-4, sugere que esta é uma doença mediada por Th2 (BONDER e KUBES, 2003).

A inflamação crônica da mucosa tem um importante papel na patogênese da asma, que é uma doença caracterizada por obstrução reversível das vias aéreas e hiperresponsividade a estímulos endógenos e externos. Achados histopatológicos incluem infiltração maciça de linfócitos T ativados, mastócitos, macrófagos e eosinófilos para o interior e ao redor do epitélio brônquico, dilatação dos vasos sanguíneos, perda da camada superficial do epitélio, edema de mucosa e hipertrofia das glândulas submucosas e do músculo liso brônquico (CUZZOCREA, 2005; LAMPINEN *et al.*, 2004).

Os glicocorticóides estão entre os fármacos mais usados na terapia de doenças alérgicas como a asma. Em parte, devido a supressão das citocinas através da inibição do potente fator de transcrição inflamatório NF-kB (CATLEY

et al., 2003; CUZZOCREA, 2005; LAMPINEN *et al.*, 2004; RANG *et al.*, 2004) e pela indução de apoptose de eosinófilos. O tratamento com glicocorticóides também leva a níveis aumentados de IL-12, que é apoptótica. Agonistas β_2 , inalados rapidamente, são o tratamento mais efetivo nas crises agudas, mas, com o tempo, além da dessensibilização dos receptores, estes agonistas aumentam a produção de anticorpos IgE e levam ao desenvolvimento da crise (CUZZOCREA, 2005; SANDERS, 2006). A teofilina, um dos fármacos alternativos, é usada no tratamento da asma por seus efeitos relaxantes sobre o músculo liso brônquico, e tem se observado que a teofilina é capaz de acelerar a apoptose espontânea em eosinófilos e neutrófilos e diminuir a sobrevivência de eosinófilos induzida pela IL-5, entretanto não é capaz de substituir a terapia padrão com glicocorticóides e agonistas β_2 (CUZZOCREA, 2005; LAMPINEN *et al.*, 2004).

Observa-se que existe um repertório vasto de terapias para o tratamento de doenças de origem inflamatória como asma, AR, lupus eritematoso sistêmico, doença de Crohn, esclerose múltipla, artrite psoriática e vasculite sistêmica. Entretanto, tais terapias apresentam efeitos indesejáveis, por exemplo, esteróides podem causar osteoporose e deficiência na cicatrização, enquanto os novos inibidores seletivos da COX-2 podem reduzir a síntese do protetor vascular, a prostaciclina, aumentando o risco de trombose. De fato, experiências com a terapia neutralizadora de TNF- α também têm revelado complicações. Estudos clínicos indicam que estes fármacos não podem ser administrados em pacientes com insuficiência cardíaca, ou com histórico de doença desmielinizante. Além disso, pode ocorrer a ativação de tuberculose latente, ou outras doenças oportunistas como pneumonia e aspergilose. Estes efeitos colaterais se devem à inibição de fatores endógenos essenciais à fisiologia normal, ou, no caso dos anti-TNF- α , por suprimir a capacidade do hospedeiro se defender adequadamente contra infecções, dado que a resposta inflamatória inata é um evento benéfico de defesa (GILROY *et al.*, 2004). Em doenças autoimunes como AR e lupus eritematoso sistêmico, há casos de resistência aos glicocorticóides devido ao uso prolongado necessário a esses casos (MOHR e PELLETIER, 2006).

Fármacos AINE são os medicamentos mais comumente usados no alívio dos sintomas, particularmente dor e inflamação. Contudo, também causam

sérios efeitos adversos e os mais importantes vão de uma lesão gástrica à ulceração, falência renal e asma. Tentativas de desenvolver AINE desprovidos da toxicidade clássica, principalmente lesão gastrointestinal (GI), seguem várias estratégias (BERTOLINI, 2001; HAWKEY, 2001). Os AINE foram associados com agentes gastroprotetores, como o misoprostol (análogo de PGE₁), antagonistas do receptor H₂ da HIS e inibidores da bomba de prótons; estas associações têm a intenção de manter a síntese de muco diante da inibição da síntese de PG, e diminuir a secreção ácida gástrica, respectivamente (BERTOLINI, 2001; RANG *et al.*, 2004). Entretanto, a terapia combinada introduz outros problemas de farmacocinética, toxicidade, e adesão do paciente, podendo também propiciar o aparecimento de novos efeitos colaterais inesperados. Mais recentemente, a incorporação de um gerador de NO à molécula de diversos AINE, mostrou intensa diminuição da atividade ulcerogênica. No entanto, achados sugerem um possível envolvimento do NO na patogênese da artrite e subsequente destruição tecidual (BERTOLINI, 2001).

Enfim, situações patológicas em que a resposta inflamatória se torna um fator de lesão, perda das funções normais do organismo e até mesmo um fator de risco de morte, possuem inúmeras alternativas terapêuticas. Contudo, tais alternativas mostram-se apenas paliativas, e/ou apresentam efeitos colaterais que, muitas vezes, se sobrepõem às vantagens do tratamento. Desta forma, a busca por novas abordagens terapêuticas, e/ou tratamentos antiinflamatórios com menos efeitos colaterais, é compreensivelmente constante e, na maioria das vezes, parte do uso popular de remédios caseiros; fonte inesgotável de novos fármacos.

1.3 Plantas com atividade antiinflamatória

A natureza, através dos medicamentos a base de plantas, tem sido usada desde tempos remotos para o tratamento de uma infinidade de doenças (CALIXTO, 2000; KHAN, 2006; SARTI e CARVALHO, 2004). Estes tratamentos, desenvolvidos a centenas de gerações passadas, tornaram-se conhecidos como medicina tradicional. A humanidade possui grande dívida para com incontáveis autores anônimos que reuniram informações da medicina

Greco-romana, Chinesa, Ayurveda e de outros sistemas de medicina tradicional, assim como grandes escribas e sábios shamans que passaram seus conhecimentos de forma verbal (KHAN, 2006). No Brasil, onde existem cerca de 120.000 espécies de plantas superiores, os indígenas usaram e ainda fazem uso de vários vegetais como tratamento para seus males ou como veneno em suas guerras e caçadas (SARTI e CARVALHO, 2004).

De acordo com estimativas da organização mundial da saúde (OMS), mais de 80% da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional ou de medicamentos a base de plantas, como sua fonte primária de cuidados com a saúde (WHO, 2002).

Assim, as plantas medicinais têm apresentado importante participação na saúde mundial. Contrariando os grandes avanços observados em décadas recentes na medicina moderna, as plantas ainda contribuem muito para os cuidados com a saúde. As plantas medicinais possuem distribuição mundial, mas são mais diversificadas nos países tropicais. O interesse em medicamentos derivados de plantas superiores, especialmente os fitoterápicos, aumentou expressivamente na última década. Estima-se que em torno de 25% de todos os medicamentos modernos sejam derivados, direta ou indiretamente de plantas superiores (CALIXTO, 2000).

O primeiro, e um dos maiores exemplos do desenvolvimento de fármacos a partir de remédios vegetais é o ácido salicílico, obtido das cascas de espécies de salgueiro (*Salix* spp). As propriedades analgésicas e antipiréticas destas cascas são conhecidas de antigas civilizações, como o antigo Egito, Grécia, Índia e Roma. O primeiro relato do seu uso é encontrado no papiro de Ebers, uma reunião egípcia de dados medicamentosos, datado de mais de 3500 anos. A oxidação da salicina, um constituinte da casca do salgueiro, origina o ácido salicílico, que teve seu uso limitado por causar intensa irritação gástrica. Mais tarde, a acetilação da molécula deu origem ao ácido acetilsalicílico, um dos fármacos de maior sucesso da história (ROBERTS II e MORROW, 2003; SETTY e SIGAL, 2005).

Produtos naturais, incluindo os derivados de plantas superiores têm dado, nos últimos anos, grande contribuição para o desenvolvimento de terapias farmacológicas modernas. A maioria dos metabólitos secundários derivados de plantas são conhecidos por interferir, direta ou indiretamente, com

moléculas ou mecanismos como mediadores inflamatórios, exemplos são os metabólitos do AA e as citocinas; produção e/ou ação de segundos mensageiros, como AMPc, GMPc, proteínas quinases e cálcio; expressão de fatores de transcrição como o NF-kB, e de proto-oncogenes, c-jun e c-fos; e intervenção na expressão de moléculas pró-inflamatórias como a iNOS, COX-2, IL-1 β , TNF- α , neuropeptídeos e proteases (CALIXTO *et al.*, 2003).

Muitas plantas cuja indicação popular aborda a resposta inflamatória são alvos para o estudo de novas alternativas terapêuticas para esta área. Este uso popular é muitas vezes confirmado pelos resultados das pesquisas científicas, como pode ser observado com os exemplos citados a seguir e resumidos na tabela 1.

Gengibre é a raiz da planta *Zingiber officinale* Roscoe, família Zingiberaceae. Originária da Índia e Ásia Tropical e aclimatada no Brasil, usada mundialmente como importante especiaria e planta medicinal (CARVALHO e SILVA, 2004; ZHOU, *et al.*, 2006). Tem sido usado a milhares de anos na medicina Ayurveda e Sino-Japonesa, para inflamação e reumatismo. Outras indicações incluem vertigem, náusea e vômitos (SETTY e SIGAL, 2005). O estudo de seus extratos apresentou algumas atividades farmacológicas, incluindo ação antiinflamatória, antiemética, analgésica, anti-tumor, e antioxidativa. Estudos clínicos também sugerem que o gengibre, ou seus extratos, podem ser usados na artrite e outras dores crônicas associadas a doenças inflamatórias (ZHOU *et al.*, 2006). Quanto aos mecanismos de ação, verificou-se a inibição da COX, da biossíntese de leucotrienos e de TNF- α (SETTY e SIGAL, 2005).

O picão, nome popular da planta *Bidens pilosa* L., é popularmente usado para tratamento de inflamações, hepatite, icterícia neonatal, dismenorréia e diabetes, dentre outras indicações populares (CARVALHO, 2004; HORIUCHI e SEYAMA, 2006). Pertence à família Asteraceae e tem distribuição mundial, sendo considerado cosmopolita tropical. Estudos comprovaram suas ações imunossupressora (PEREIRA *et al.*, 1999) e antiinflamatória, sendo esta última por inibir a produção de IgE e a liberação de HIS pelos mastócitos, e permitir a permeabilidade vascular local. Possui flavonóides e derivados do ácido cafêico, que têm comprovada ação captadora de radicais livres, além dos efeitos relatados para o extrato (HORIUCHI e SEYAMA, 2006).

A *Uncaria tomentosa* é uma erva peruana da família Rubiaceae, conhecida popularmente como unha-de-gato. Possui indicação para inflamação crônica, gastrite, úlcera gástrica e AR (PERAZZO, 2004). Há relatos de sua efetividade no tratamento de doenças inflamatórias como asma e artrite (CISNEROS *et al.*, 2005; SETTY e SIGAL, 2005). É capaz de inibir a produção de TNF- α e, em menor extensão, de PGE₂, tem atividade antioxidante e captadora de radicais livres (GONÇALVES *et al.*, 2005). Foi ainda verificado que a unha de gato pode proteger as células contra o estresse oxidativo por impedir a ativação do NF- κ B (CISNEROS *et al.*, 2005).

Harpagophytum procumbens é uma planta perene nativa da África do Sul, pertence a família Pedaliaceae e é popularmente conhecida como garra-do-diabo, por suas frutas serem cobertas de espinhos com forma de gancho. Também é conhecida por suas ações antiinflamatória e analgésica, onde inibe a biosíntese de eicosanóides, principalmente dos cisteinil leucotrienos. O principal composto encontrado em seus tubérculos é o harpagosídeo, da classe dos glicosídeos iridóides (LIMA e CARVALHO, 2004; SETTY e SIGAL, 2005).

A calêndula, *Calendula officinalis* L, da família Asteraceae, é uma planta de brotamento anual, nativa da Europa central e Mediterrâneo. Tem seu uso medicinal registrado desde o século 12 como antipirético, antiinflamatório e para controlar a menstruação para uso interno. Tópicamente é indicado para a cura de feridas e pele inflamada e danificada, enquanto o chá é usado na conjuntivite, faringite, estomatite e gengivoestomatite, erupções cutâneas de fraldas e outras condições inflamatórias de pele e mucosa (CARVALHO, 2004). Dados publicados confirmam sua atividade antiinflamatória sistêmica e tópica e seus álcoois triterpênicos apresentam importante atividade antiinflamatória (AKIHISA *et al.*, 2006; CARVALHO, 2004; NEUKIRCH *et al.*, 2005), anti-promoção de tumor e citotóxica (UKIYA *et al.*, 2006). Pela sua ação cicatrizante, cura ou diminui a gastrite e a úlcera duodenal; o ácido oleanólico favorece a regeneração de tecidos danificados e possuem ação anti-séptica, e os flavonóides reforçam a ação cicatrizante e são úteis nas cólicas menstruais. Estudos clínicos mostraram que o chá melhora os sintomas da colite e outros estudos sugerem efeito sedativo do extrato e efeitos sinérgicos com barbitúricos; efeitos estrogênicos e uterotônicos em útero isolado de coelha e cobaia, e em ratas ovariectomizadas. Ensaios *in vitro* demonstraram a

estimulação da fagocitose pelos polissacarídeos e a inibição da LOX pelos glicosídeos presentes no extrato da calêndula (CARVALHO, 2004).

Muitas plantas são vulgarmente chamadas por camomilas, e como tais utilizadas na farmacopéia popular. As descobertas empíricas de Discórides sobre a ação emenagoga da camomila foram confirmadas por trabalhos laboratoriais 19 séculos mais tarde, e dizem respeito às espécies *Matricaria chamomila* L. e *M. recutita* L., pertencentes à mesma família da calêndula, *Asteraceae* ou *Compositae*. São ervas anuais que crescem espontaneamente na Europa e em algumas regiões da Ásia. Seu uso interno é indicado em casos sintomáticos de distúrbios digestivos como dispepsia, dor epigástrica, má digestão e flatulência, e de irritações do trato respiratório. Externamente, é indicada para inflamação e irritação de pele e mucosas (CARVALHO, 2004). A confirmação da efetividade do uso da camomila em quadros inflamatórios vem ocorrendo há várias décadas. Em 1981, SHIPOCHLIEV e colaboradores demonstraram que o liofilizado de *Matricaria chamomilla* L. diminui a inflamação e o infiltrado leucocitário induzida pela injeção simultânea de carragenina e PGE₁. Mais recentemente descobriu-se a presença de um antagonista não peptídico do receptor das taquicininas NK1 nas flores da *Matricaria chamomilla* e em mais quatro outras espécies da família *Compositae* (YAMAMOTO *et al.*, 2002). Os extratos das flores também inibem a ação pruritogênica do composto 48/80 (KOBAYASHI *et al.*, 2003; 2005). Os principais constituintes das flores incluem compostos fenólicos como os flavonóides apigenina, quercetina, patuletina, luteolina e seus glicosídeos, enquanto o óleo essencial é formado principalmente pelos terpenos α -bisabolol e seus óxidos e azulenos como o camazuleno. Sua presença, bem como a bioatividade e potenciais benefícios à saúde do chá de camomila são revisados por MCKAY e BLUNBERG (2006).

Um dos vegetais imunomoduladores mais efetivos pertence à família *Asteraceae* e ao gênero *Echinacea*, de onde vem seu nome popular, equinácia (DI CARLO *et al.*, 2003). Este gênero compreende nove espécies, das quais se destacam a *E. angustifolia*, *E. purpurea* e *E. pallida*. São plantas originárias dos Estados Unidos e vêm sendo usadas pelos índios há séculos. Na Alemanha, onde um produto obtido do suco da *Echinacea purpurea* já passou por mais de 150 estudos clínicos, hoje é prescrita por médicos, e existem preparações

injetáveis contendo seus extratos. O uso de suas preparações se dá como adjuvante terapêutico em casos de infecção, inflamações crônicas e como estimulante inespecífico do sistema imune, indicações justificadas na revisão feita por LIMA e CARVALHO (2004). Estudos levam a crer que o efeito estimulante do sistema imune esteja baseado em três mecanismos: ativação da fagocitose e estimulação de fibroblastos; aumento da atividade respiratória; aumento da mobilidade de leucócitos (LIMA e CARVALHO, 2004). O tratamento com extrato de *Echinacea purpúrea* aumenta a resistência de linfócitos à apoptose em camundongos (DI CARLO *et al.*, 2003). Extratos e alquilamidas presentes em preparações de *Echinacea* inibem de forma potente a inflamação induzida por LPS em sangue humano e exerce efeitos modulatórios sobre a expressão de citocinas nestas amostras (BARAK *et al.*, 2002; RADUNER *et al.*, 2006), e em células epiteliais infectadas, ou não, por Rhinovírus (SHARMA *et al.*, 2006). Efeitos semelhantes aos obtidos com o endocanabinóide anandamida e que parecem ser mediados pela ligação a receptores CB₂ (GERTSCH *et al.*, 2006; RADUNER *et al.*, 2006). Alquilamidas poliinsaturadas também demonstraram inibição da atividade da COX e da 5-LOX de leucócitos. Experimentos *in vivo* da década de 1980 demonstraram ação antiinflamatória tópica da fração polissacarídica da *E. angustifolia*, sobre o edema de pata induzido pela carragenina e no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (LIMA e CARVALHO, 2004).

Tabela 1: Plantas com atividade antiinflamatória confirmada por estudos científicos.

Planta	Nome Científico	Atividades Confirmadas	Mecanismos de Ação
Salgueiro (gênero)	<i>Salix</i> spp	Analgésico e antipirético.	Inibe as isoformas 1 e 2 da COX.
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Antiinflamatório, antiemético, analgésico, antitumoral, antioxidante.	Inibe as isoformas 1 e 2 da COX, a síntese de LT e de TNF- α .
Picão	<i>Bidens pilosa</i> L.	Imunossupressor e antiinflamatório.	Inibe a liberação de HIS pelos mastócitos, a produção de IgE, e permite a permeabilidade vascular.
Unha-de-gato	<i>Uncaria tomentosa</i>	Atividade antiinflamatória na asma e artrite.	Impede a ativação do NF-kB, e a produção de TNF- α e PGE ₂ . Possui ação antioxidante e captadora de radicais livres.
Garra-do-diabo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Antiinflamatório e analgésico.	Inibe a produção de eicosanóides, principalmente dos cisteinil-LT.
Calêndula	<i>Calendula officinalis</i> L.	Antiinflamatório, antitumoral, cicatrizante, sedativa, estrogênica.	Estimula a fagocitose e inibe a LOX.
Camomila	<i>Matricaria chamomila</i> L., <i>M. recutita</i> L.	Antiinflamatório, espasmolítico.	Antioxidante, inibe 5-LOX.
Equinácia (3 principais espécies)	<i>E. angustifolia</i> , <i>E. purpurea</i> <i>E. pallida</i> .	Antiinflamatória e imunoestimulante.	Estimula a fagocitose e fibroblastos, aumenta a atividade respiratória, aumenta a mobilidade leucocitária, inibe a COX e a 5-LOX, ativa CB ₂ .

1.4 *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi

A *Garcinia gardneriana* (fig. 2 – A, B e C) pertence à família Clusiaceae, pode ser encontrada sob a sinonímia botânica de *Rheedia gardneriana*, da família Guttiferae, e é conhecida popularmente como “bacupari”, “bacopari”, “bacupary miúdo” ou “mangostão amarelo”. É uma árvore de porte médio, copa piramidal, folhas opostas, pecioladas, que floresce nos meses de agosto a setembro. Possui um fruto amarelo com polpa mucilaginosa, branca, comestível. O bacupari é nativo do interior da mata atlântica e facilmente encontrado na beira de rios e córregos (CORRÊA, 1984; GUIMARÃES *et al.*, 2004).

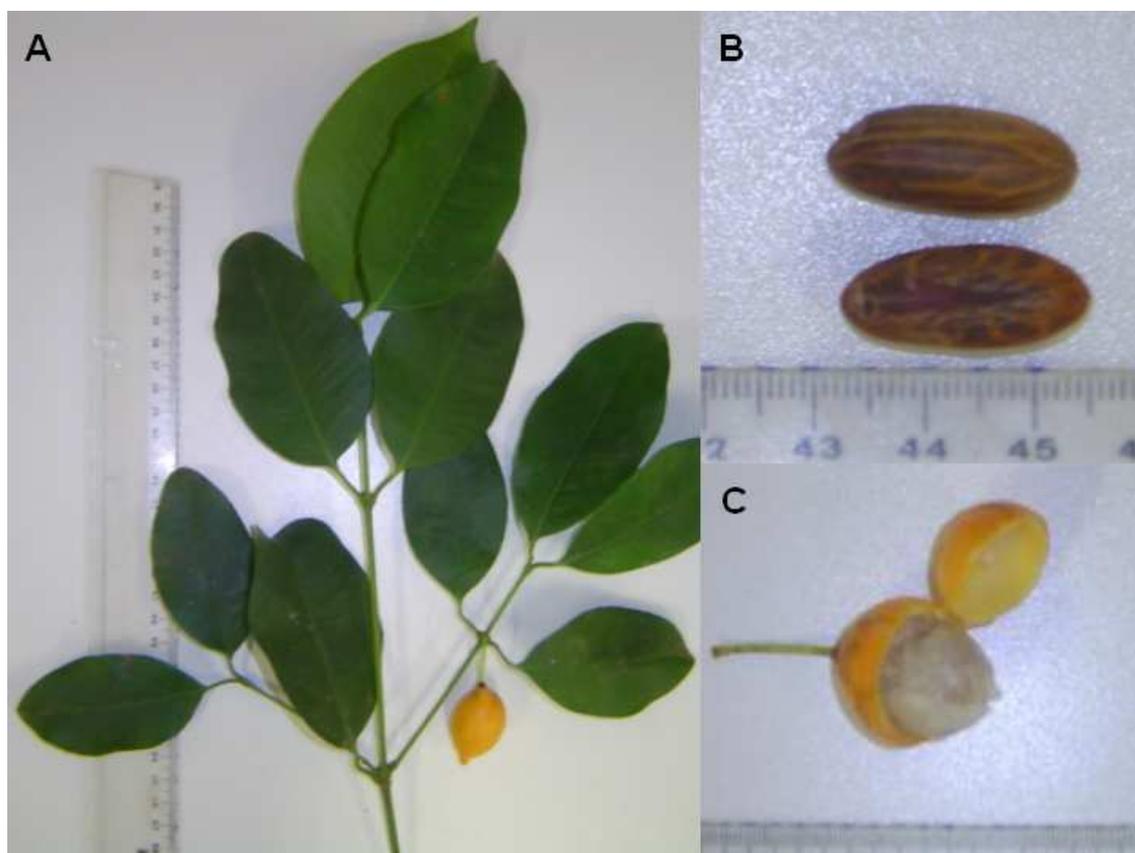


Figura 2: Partes aéreas da *Garcinia gardneriana* (Pl. & Tr.) Zappi. Folhas e fruto (A); foco da semente (B); foco do fruto mostrando a polpa (C) (Cortesia Prof^o Dr^o Michel F. Otuki).

Estudos fitoquímicos com a *G. gardneriana* revelaram a presença de diversas xantonas, os triterpenos lupeol e betulina, e o esteróide β -sitosterol, nas cascas e madeira da planta (BRAZ FILHO, *et al.*, 1970; DELLE MONACHE, *et al.*, 1983; DELLE MONACHE, *et al.*, 1984). Também foram

identificados, principalmente nas folhas, flavonóides como os biflavonóides volkensiflavona, 13-naringenina-118-eriodictiol (GB-2a), GB-1a, fukugetina (moreloflavona) (BOTTA *et al.*, 1984), fukugesida, figura 3 (LUZZI *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2000) e 13-naringenina-118-4'-OMe-eriodictiol (GB-2a-11-4'-Ome) (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2000).

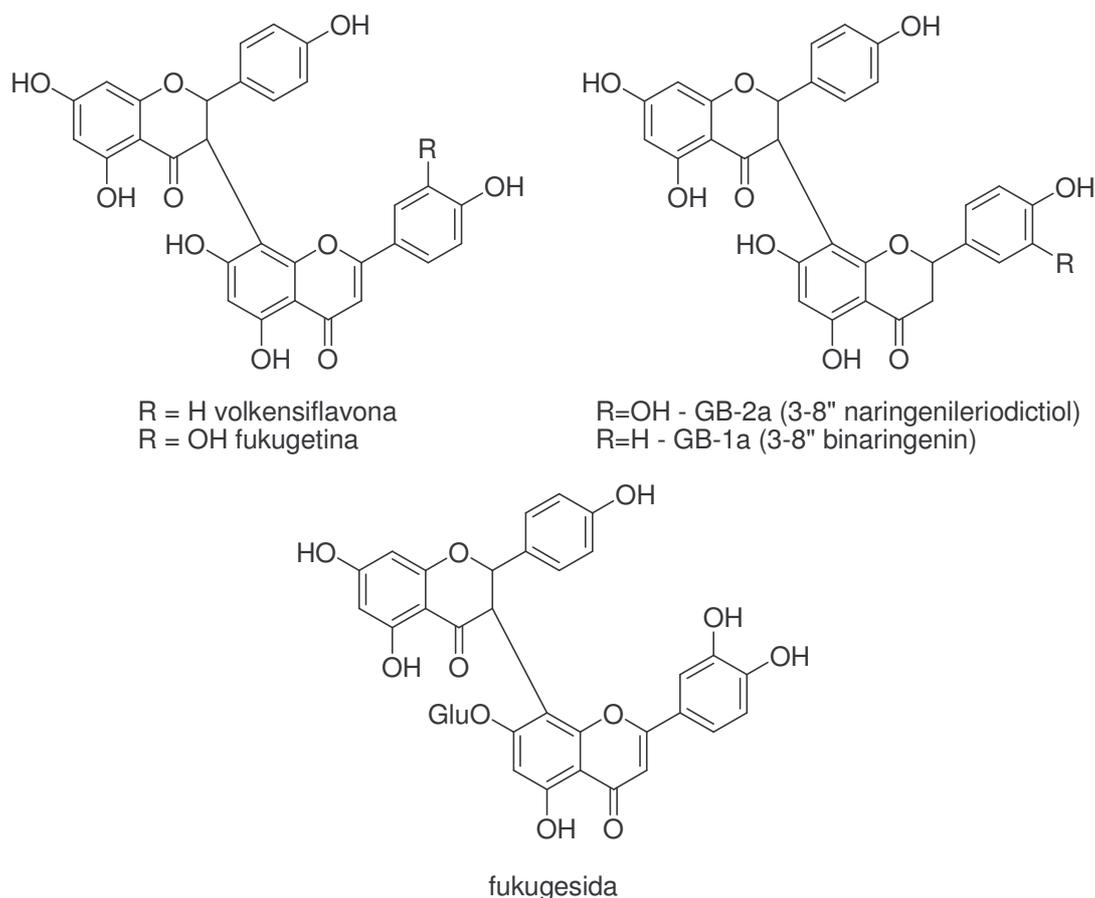


Figura 3: Biflavonóides da *Garcinia*. Estrutura química dos biflavonóides volkensiflavona, fukugetina, GB-1a, GB-2a e fukugesida.

Na medicina popular é indicada para o tratamento de inflamações, dores, infecções urinárias e outros tipos de infecções (GUIMARÃES *et al.*, 2004). Estudos têm caminhado para confirmar muitas dessas atividades. Guimarães e colaboradores (1996a e b) demonstraram que o extrato hidroalcoólico da *G. gardneriana* possui atividade vasodilatadora sobre aorta isolada e efeito antiinflamatório em modelos de pleurisia, ambos em ratos.

As folhas da *G. gardneriana*, parte mais usada na medicina popular, possuem os biflavonóides volkensiflavona, 13-naringenina-118-eriodictiol (GB-

2a), GB-1a, fukugetina, fukugesida, que apresentaram significativa ação analgésica em relação à segunda fase do teste da formalina (dor inflamatória) (LUZZI *et al.*, 1997). O último biflavonóide isolado das folhas, I3-naringenina-II8-4'-OMe-eriodictiol (GB-2a-II-4'-Ome), apresentou efeitos analgésicos, dependentes da dose, no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina (CECHINEL FILHO *et al.*, 2000). Cechinel Filho e colaboradores (2000) e Luzzi e colaboradores (1997), indicaram estes compostos como os principais responsáveis pelas atividades analgésicas da planta.

Observou-se ainda que os flavonóides isolados das folhas da *G. gardneriana*, fukugetina, fukugesida e volkensiflavona, entre outros, possuem atividade antibacteriana contra diversas bactérias gram-positivas (VERDI *et al.*, 2004). Outro composto isolado, a 7-epiclusianona, foi ativo contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi in vitro*, mas inativo quando testado em camundongos infectados (ALVES *et al.*, 1999). O mesmo composto apresentou, em baixas concentrações, efeito vasodilatador dependente do endotélio sobre anéis de aorta, isoladas de ratos; e em altas concentrações da 7-epiclusianona, com a NOS inibida, houve vasoconstrição, que foi anulada por inibidores seletivos da COX e 5-LOX. Desta forma, o NO parece participar da vasodilatação, enquanto o efeito vasoconstritor pode ser mediado por produtos derivados da COX e 5-LOX endoteliais (CRUZ *et al.*, 2006).

A *G. gardneriana*, com sua constituição rica em metabólitos farmacologicamente ativos, ampla distribuição e fácil cultivo; características somadas às atividades antiinflamatórias que serão demonstradas no presente trabalho, mostra-se como promissora fonte para o desenvolvimento de alternativas aos antiinflamatórios em uso atualmente.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar os possíveis efeitos dos extratos da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi, na resposta inflamatória em camundongos, bem como, investigar alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos.

2.2 Específicos

- Analisar o efeito antiinflamatório dos extratos brutos hidroalcoólico da folha, casca e semente da *G. gardneriana* (EHGG), assim como dos biflavonóides isolados do EHGG da folha, no modelo de edema de pata induzido pela carragenina em camundongos;
- Verificar o efeito dos EHGG na atividade da enzima mieloperoxidase, após a indução de edema de pata pela carragenina em camundongos;
- Acompanhar o curso temporal do efeito do extrato mais potente, sobre o modelo de edema de pata induzido pela carragenina em camundongos;
- Analisar histologicamente o efeito do EHGG no infiltrado celular em patas de camundongos tratadas com carragenina;
- Avaliar o efeito do EHGG sobre o edema de pata induzido por diversos mediadores envolvidos na resposta mediada pela carragenina (HIS, BK, SP, AA, prostaglandina E₂).

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss adultos de ambos os sexos (18 a 35 g), provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por um período de pelo menos 1 hora (h) antes da realização dos experimentos. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFPR sob protocolo nº 127.

3.2 Classificação botânica

A *Garcinia gardneriana* foi coletada na cidade de Blumenau e identificada pelo professor Marcos Sobral (Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre). Um exemplar está catalogado no herbário Dr. Roberto Miguel Klein (Departamento de Ciências Naturais, FURB, Blumenau) sob o registro 534 a 540.

3.3 Coleta, extração e preparo do material vegetal

A obtenção dos extratos brutos hidroalcoólicos das folhas, cascas e sementes da *G. gardneriana*, bem como a identificação, isolamento e purificação dos compostos foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof^o Dr^o Valdir Cechinel Filho do Departamento de Química da Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

Folhas, cascas e sementes de *Garcinia gardneriana*, provenientes da Mata Atlântica na Região do Vale do Itajaí, foram colhidas e depositadas no herbário da Universidade Regional de Blumenau, após lavagem, foram postas em estufa à 40°C para secagem. Em seguida, foram trituradas e deixadas em maceração por 7 dias em solução hidroalcoólica (50% v/v) em frascos de vidro

âmbar, sendo agitadas periodicamente. Após a maceração a mistura foi filtrada em papel filtro e concentrada através de um aparelho rotavapor (temperatura máxima de 50 °C). O extrato obtido foi particionado com solventes de polaridades crescentes, como o n-hexano, diclorometano e acetato de etila, sendo obtido o extrato semipuro.

3.4 Isolamento e purificação dos compostos

A partir dos extratos polares obtidos, foram isolados possíveis princípios ativos com atividade analgésica e/ou inflamatória. O isolamento dos compostos foi através do uso de procedimentos cromatográficos, como cromatografia em camada delgada para monitoramento e cromatografia em coluna usando sílica ou sephadex LH-20 como fase estacionária. A elucidação estrutural dos compostos foi realizada por métodos espectroscópicos usuais, como IV, H-RMN e 13 C-RMN.

3.5 Drogas e soluções usadas

- Carragenina lambda (Sigma, Chemicals & Co, EUA)
- Dexametasona (Sigma, Chemicals & Co, EUA)
- Bradicinina (BK) (Sigma, Chemicals & Co, EUA)
- Captopril (Sigma, Chemicals & Co, EUA)
- Histamina (HIS) (Sigma, Chemicals & Co, EUA)
- Ácido araquidônico (Sigma, Chemicals & Co, EUA)
- Prostaglandina E₂ (PGE₂) (Sigma, Chemicals & Co, EUA)
- Substância P (SP) (Alexis, Biochemicals, Suécia)
- Composto 48/80 (Alexis, Biochemicals, Suécia)
- 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) (Sigma, Chemicals & Co, EUA)
- HTAB, TMB, peróxido de hidrogênio, tampão fosfato (Sigma Chemical Co, EUA)
- dimetilformamida, acetona, formaldeído, ácido acético glacial (Merck Biosciences, Germany)

- eosina, hematoxilina, álcool absoluto, xilol, floxina B (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)

Os demais sais e reagentes utilizados foram de alto grau de pureza analítica e procedência Merck Biosciences, Alemanha.

Os extratos brutos de *G. gardneriana*, quando administrados pela via oral, foram diluídos em água destilada morna, aproximadamente 27 °C. Para a administração intraperitoneal, os extratos foram diluídos em salina (NaCl 0,9 %) morna.

A dissolução dos compostos foi feita através do preparo de uma solução em etanol P.A. que foi diluída em tween 80 e salina. As concentrações finais de etanol e tween não atingiram 0,5%.

O TPA, quando aplicado por via tópica, foi diluído apenas em acetona. O AA e a PGE₂ foram diluídos em uma solução contendo salina e etanol absoluto. A concentração final do etanol não excedeu 0,5%, de modo a não influenciar o efeito dos agentes flogísticos. As demais drogas foram diluídas em salina.

3.6 Métodos

3.6.1 Edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Esta é uma metodologia que permite a observação do efeito sistêmico da substância teste através da indução de um estímulo inflamatório local. O edema é induzido pela administração intraplantar (i.pl.) de carragenina (300 ug/pata, i.pl.) na pata traseira direita dos camundongos (adaptado de LEVY,1969).

A espessura da pata traseira dos animais foi avaliada com o uso de um micrômetro digital (GREAT, MT – 04513) sendo essa a medida basal. Em seguida, para avaliar o efeito dos EHGG (folha, casca e semente) e dos compostos isolados fukugetina e GB-2a, os mesmos foram administrados por via oral (v.o.) e/ou intraperitoneal (i.p.), 60 e 30 min (minutos) antes da administração da carragenina, respectivamente. Outro grupo de animais foi tratado com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), 30 min antes da indução do edema (grupo controle positivo). Após os respectivos tempos para cada via de

administração, a carragenina foi injetada (300 µg/pata, i.pl.) na pata direita no volume de 50 µL. A espessura da pata traseira direita foi avaliada novamente com o micrômetro 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a aplicação do estímulo inflamatório. Os resultados são expressos como a diferença entre a espessura da pata a cada tempo e a espessura antes da injeção de carragenina (basal).

3.6.2 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase

MPO é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, e comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de PMN que migram para o local do estímulo inflamatório. A atividade da enzima MPO foi avaliada utilizando metodologia de Bradley e colaboradores (1982) com algumas adaptações. As amostras das patas do edema por carragenina foram colhidas na 6^a h após a indução da inflamação, foram pesadas, e a elas foi adicionado 0,75 mL de tampão fosfato de sódio (PBS) 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e foram homogeneizadas por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 12000 x *g* a 4°C por 15 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de PBS 80 mM pH 5,4, 85 µL, PBS 0,22 M pH 5,4 e 15 µL de H₂O₂ 0,017% em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi incubada a 37°C por 3 min e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) na absorvância de 630 nm e expressa como mDO/mg de tecido.

Em outro experimento, a fim de se verificar o efeito do extrato diretamente sobre a atividade enzimática, quando os leucócitos já migraram para o local do estímulo inflamatório, o extrato foi incubado diretamente com a

amostra tecidual, após esta ser adicionada à placa, durante 15 min, antes que se continuasse com o protocolo descrito, com a adição do H₂O₂.

3.6.3 Análise histológica

Para realizar a análise histológica das patas, amostras de camundongos submetidos ao modelo de edema de pata por carragenina foram colhidas na 4^a h (pico do edema), fixadas em líquido de Alfac (solução contendo: 85% de álcool 80%; 10% de formol 40% e 5% de ácido acético glacial). As amostras foram desidratadas em álcool e xilol, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 3-4 µm e coradas com hematoxilina e eosina (RECIO *et al.*, 2000). A infiltração celular (leucócitos) foi avaliada em áreas representativas em aumento de 200x e/ou 400x.

3.6.4 Edema de pata induzido por diversos compostos em camundongos

O edema inflamatório induzido pela carragenina é mediado por mediadores pré-formados como HIS e prostaglandinas (VAJJA, *et al.*, 2004). Desta forma, a atividade do EHGG, produzido a partir das folhas, foi avaliada sobre o edema induzido por compostos como a BK, HIS, AA, prostaglandina E₂, SP, e composto 48/80 (adaptado de BRITO, *et al.*, 2007; CLAUDINO, *et al.*, 2006; PASSOS, *et al.*, 2007), fazendo uso dos mesmos procedimentos de medida apresentados para o edema induzido pela carragenina.

A espessura da pata direita dos animais foi medida com o uso de um micrômetro digital, sendo essa a medida basal. Para o experimento com a injeção intraplantar de BK, os animais foram tratados com captopril (0,5 mg/kg, s.c.) 1 h antes para prevenir a ação das cininases (CORREA e CALIXTO, 1993). Os animais foram divididos em um grupo controle e um grupo tratado com extrato, para cada agente edematogênico. Em seguida, os respectivos grupos receberam, pela via i.p., o EHGG (folha, 300 mg/kg), 30 min antes da administração dos agentes indutores. Após o tempo para a via de administração, os grupos receberam a injeção i.pl. de HIS (100 µg/pata), ou BK (3 nmol/pata), ou SP (30 nmol/pata), ou AA (1% /pata), ou prostaglandina E₂ (PGE₂ - 3 nmol/pata), ou 48/80 (100 ng/pata) na pata direita, no volume de 50

μl. A espessura da pata traseira direita foi avaliada novamente com o micrômetro a cada 15 min (HIS, BK, SP e 48/80), a cada 30 min (PGE₂), ou 1 h (AA) após a aplicação do estímulo inflamatório. Os resultados são expressos como a diferença entre a espessura da pata a cada tempo e a espessura antes da injeção dos agentes (basal).

3.6.5 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de TPA (12-O-tetradecanoilforbolacetato)

Fazendo uso dos mesmos procedimentos de medida apresentados para o edema induzido pela carragenina, os animais foram tratados com o EHGG das folhas (300 mg/kg, i.p.) e, após 30 min, receberam 50 μl de TPA (50 pmol/pata) (Ferreira *et al.*, 2005). O edema foi avaliado 1 h após a aplicação do agente.

3.6.6 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA

O edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 μg/orelha) na orelha direita de camundongos. O EHGG das folhas foi administrado por via i.p. (300 mg/kg), e 30 min depois, o TPA foi aplicado topicamente. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 6 h após a aplicação do agente flogístico (DE YOUNG *et al.*, 1989).

3.7 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.), exceto as DI₅₀ (dose ou concentração dos extratos ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle), que estão representadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%. Os dados obtidos foram avaliados por teste “t” de Student não pareado, ou análise de variância com um critério (ANOVA – *one way*). Nos casos onde foram encontradas diferenças significativas (p<0,05), os testes de comparações múltiplas de Bonferroni, ou de Dunnet, quando apropriado, foram aplicados. O nível de significância

adotado foi de 5%. Todos os cálculos realizados, exceto a DI_{50} , utilizaram o programa *GraphPad Prism* versão 3.00 para Windows (San Diego Califórnia, EUA). As DI_{50} foram estimadas a partir de experimentos individuais, utilizando o método de regressão linear através do programa “Graph Pad” ou “Instat”.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da administração oral do EHGG, produzido a partir da folha, casca e semente, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em camundongos.

A figura 4 demonstra que o EHGG preparado a partir das folhas (1 h antes), quando administrado pela via oral, foi capaz de alterar o edema de pata causado pela administração intraplantar de carragenina (300 µg/sítio). Na primeira hora após a injeção da carragenina, as doses de 250 mg/kg e 1000 mg/kg do EHGG das folhas foram capazes de reduzir em $38 \pm 9 \%$ e $39 \pm 5 \%$ o edema, sendo esta a inibição máxima (I_{max}) obtida pelo extrato neste modelo. Entretanto, na segunda hora após indução do edema somente a dose de 1000 mg/kg do extrato causou redução de $18 \pm 6 \%$ do edema de pata. As doses de 250, 500 e 1000 mg/kg reduziram em 22 ± 6 , 24 ± 7 e $21 \pm 6 \%$, respectivamente, o desenvolvimento da inflamação da pata causada pela carragenina na terceira hora. Na quarta hora houve uma inibição de $22 \pm 6 \%$ do edema pela dose de 250 mg/kg, enquanto a dose de 500 mg/kg diminuiu em $26 \pm 9 \%$ e $28 \pm 9 \%$ o edema apresentado nas quinta e sexta horas, respectivamente. Além disso, foi possível mostrar que a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 30 min antes), um conhecido antiinflamatório esteroide, reduziu quase que totalmente o edema induzido pela carragenina, inibindo em $83 \pm 7 \%$ a quarta hora e em $96 \pm 4 \%$ o edema da sexta hora.

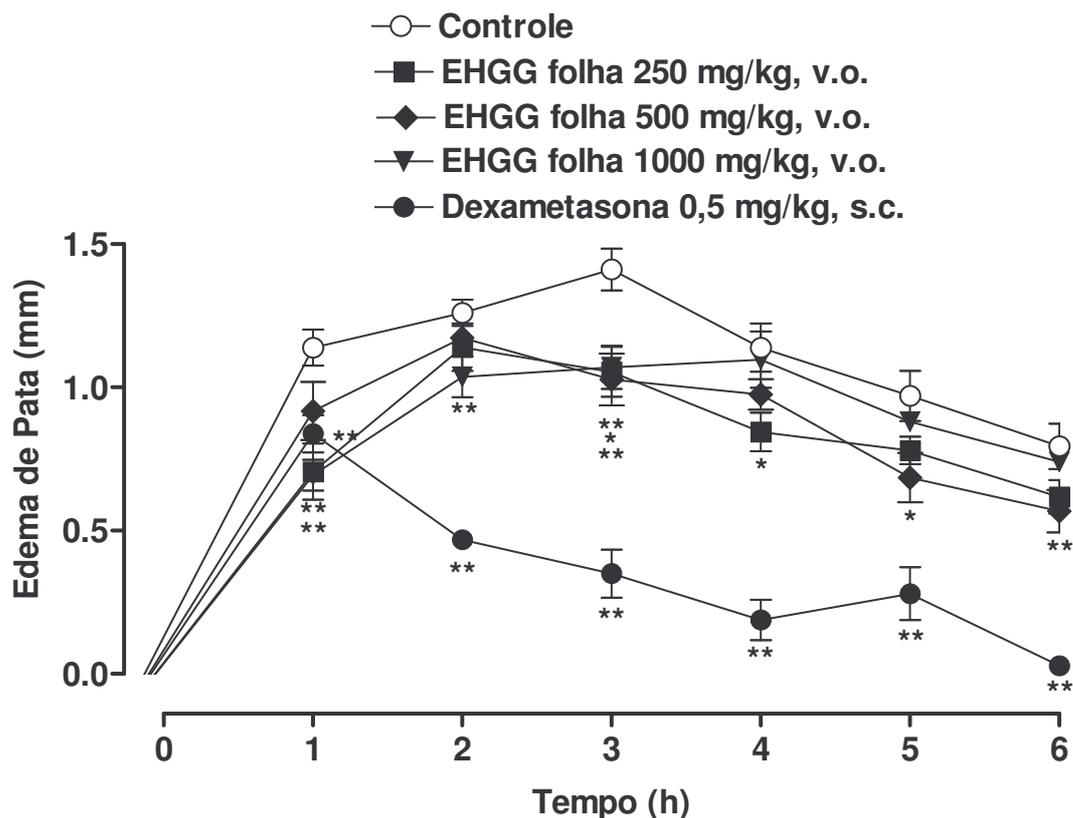


Figura 4: Efeito do tratamento oral com o EHGG das folhas, sobre o edema de pata causado pela administração de carragenina em camundongos. Os animais foram tratados com EHGG das folhas nas doses indicadas, ou veículo (controle) e após 1 h, ou 30 min, receberam a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção da carragenina. Os pontos representam a média de 5 animais e as barras verticais o E.P.M.. Na análise estatística $**P < 0,01$ foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

Outro EHGG a ser testado pela via oral no modelo de edema de pata induzido pela carragenina foi o obtido a partir das cascas. Como pode ser observado na figura 5, o tratamento dos animais com o extrato 1 h antes da carragenina causou uma importante redução na resposta edematogênica. A dose de 250 mg/kg do EHGG da casca foi a mais eficaz em inibir o edema da carragenina desde a 1ª hora até a 6ª h, apresentando I_{max} da resposta edematogênica de $78 \pm 10 \%$ na 2ª hora. As demais doses testadas causaram menor efeito sobre o edema da carragenina. A dose de 1000 mg/kg apresentou I_{max} de $40 \pm 7 \%$ na 2ª hora, enquanto a dose de 500 mg/kg inibiu da 2ª até a 6ª hora, com um valor de I_{max} de $51 \pm 14 \%$ na 6ª hora. A dexametasona (0,5

mg/kg, s.c.), administrada 30 min antes da carragenina, manteve o perfil de inibição apresentado na figura 4.

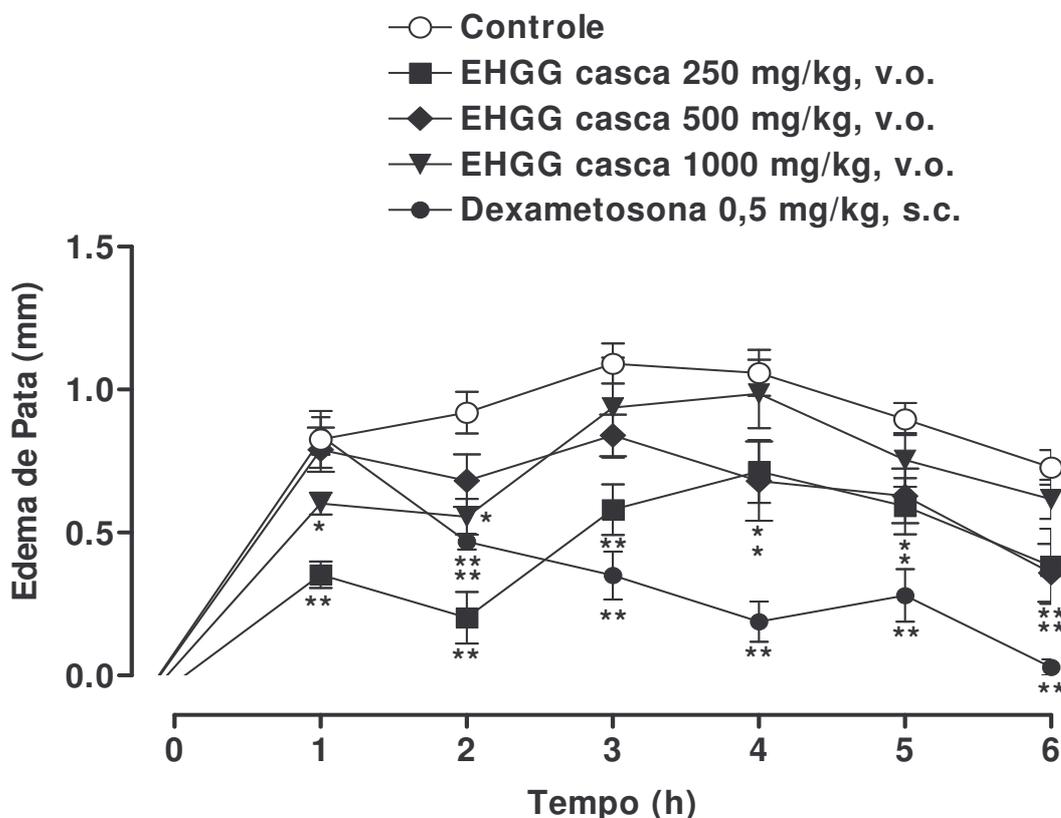


Figura 5: Efeito do tratamento oral com o EHGG das cascas, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados com EHGG das folhas nas doses indicadas, ou dexametosona, ou veículo (controle) e após 1 h, ou 30 min, receberam a injeção intraplantar de carragenina (300 μ g/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção da carragenina. Os pontos representam a média de 4 – 8 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística **P < 0,01 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

O EHGG das sementes também teve seus efeitos avaliados sobre o edema de pata induzido pela carragenina. Os dados apresentados na figura 6 indicam que o EHGG das sementes, administrado pela v.o. 1 hora antes da carragenina (300 μ g/sítio), apresenta efeito anti-edematogênico entre a segunda e a quinta hora da indução do edema. A dose de 500 mg/kg mostrou-se com maior capacidade de inibição, impedindo a manifestação completa do edema entre a 2^a e a 5^a hora, com I_{max} de 48 ± 7 % na 2^a h. As outras doses testadas apresentaram efeitos semelhantes entre si, com menor inibição. Tanto

a dose de 250 mg/kg, como a de 1000 mg/kg, reduziu o edema provocado pela carragenina na 2ª h, com inibição de $19 \pm 5 \%$ e $20 \pm 4 \%$; e na 4ª h, inibiram em $18 \pm 3 \%$ e $20 \pm 9 \%$ a formação do edema, respectivamente.

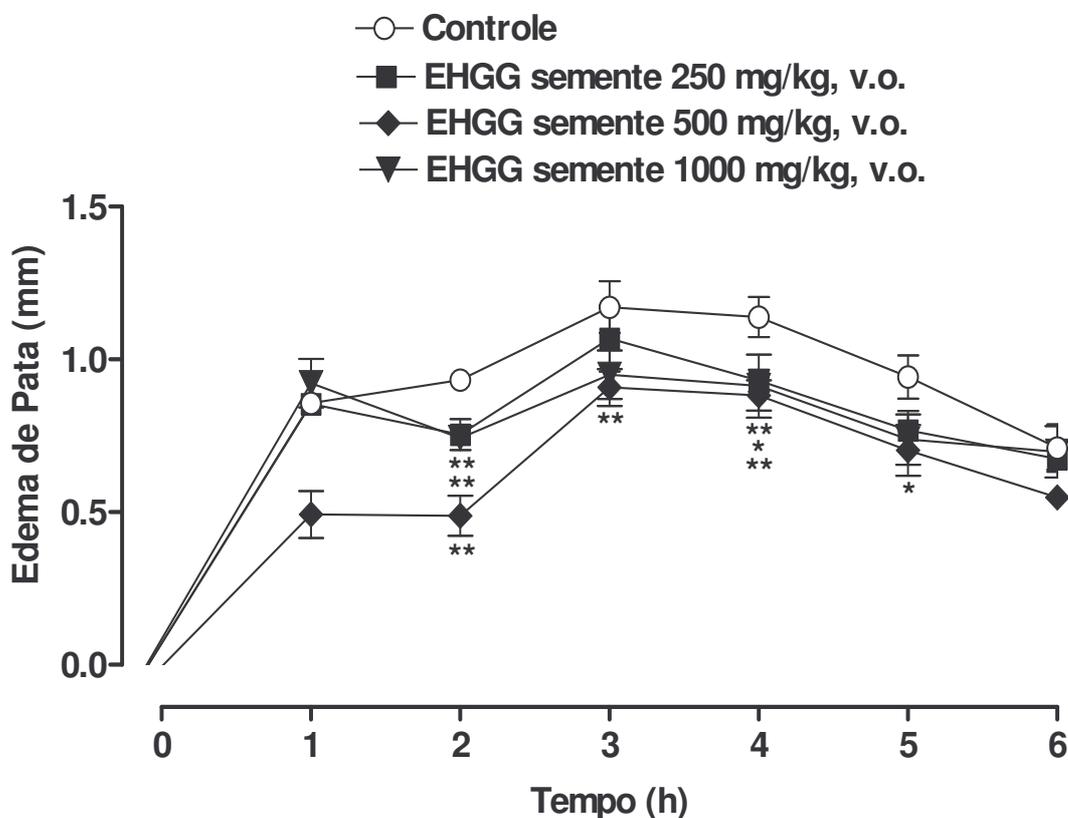


Figura 6: Efeito do tratamento oral com o EHGG das sementes, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados com EHGG das sementes nas doses indicadas, ou veículo (controle) e após 1 h, receberam a injeção intraplantar de carragenina ($300 \mu\text{g/sítio}$). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção da carragenina. Os pontos representam a média de 4 – 8 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística $**P < 0,01$ foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

4.2 Efeito da administração intraperitoneal do EHGG, produzido a partir da folha, casca e semente, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em camundongos.

Os resultados apresentados na figura 7 mostram que o tratamento com o EHGG das folhas, pela via intraperitoneal, apresentou importante efeito sobre o edema induzido pela carragenina (300 µg/sítio). O EHGG das folhas inibiu o edema durante as seis horas de avaliação, de forma dependente da dose. O valor médio da DI_{50} foi de 153,57 (79,9 – 295,3) mg/kg, e a inibição máxima de $72 \pm 4\%$ no pico da resposta edematogênica (4^a hora), para a dose de 300 mg/kg. Esta I_{max} apresentada pela dose de 300 mg/kg, superou o efeito antiinflamatório da dexametasona, que inibiu $57 \pm 4\%$ do edema na mesma hora.

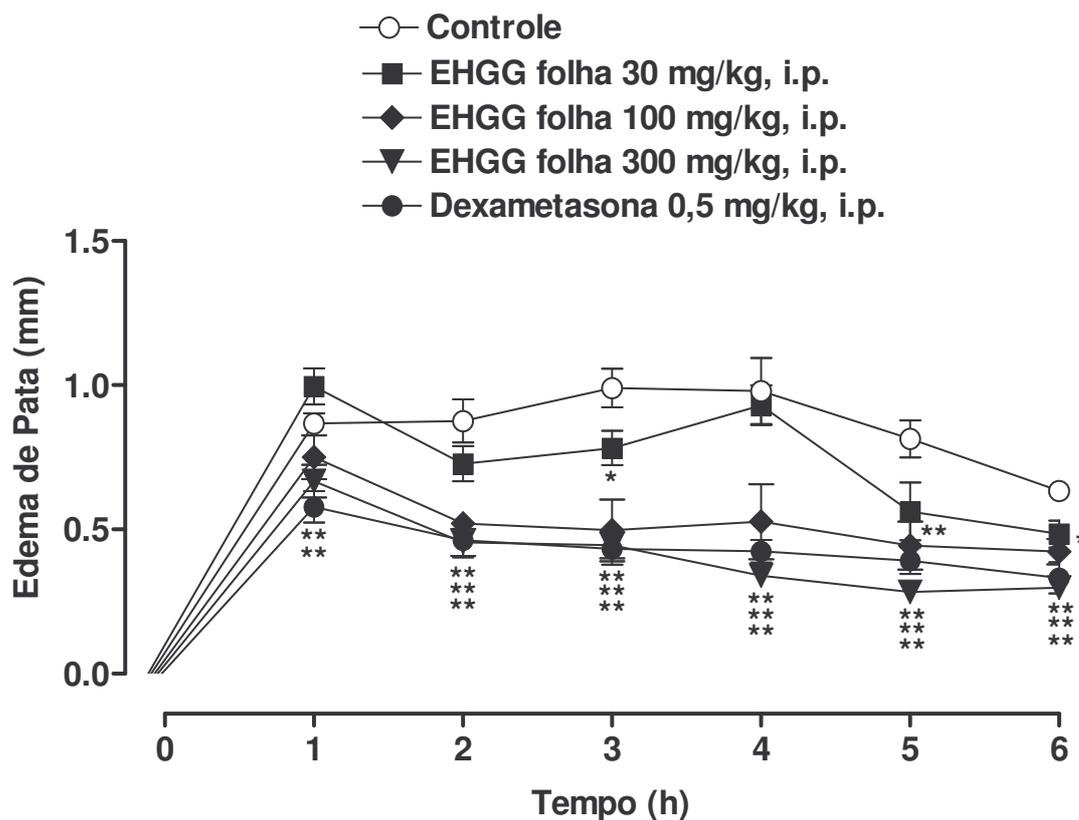


Figura 7: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados com o EHGG das folhas nas doses indicadas, ou veículo (controle), ou dexametasona (controle positivo) e após 30 min receberam a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção da carragenina. Os pontos representam a média de 4 – 8 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística **P < 0,01 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

O EHGG feito a partir das cascas da *G. gardneriana*, quando administrado pela via intraperitoneal 30 min antes, também apresentou efeito sobre a ação da carragenina (300 µg/sítio), conforme indicado na figura 8. O EHGG das cascas diminuiu a capacidade da carragenina induzir edema nas patas dos camundongos até a quinta hora, com intensidade dependente da dose. A maior inibição coincidiu com o pico edematogênico, onde o extrato apresentou uma DI_{50} de 132,47 (82,96 – 211,54) mg/kg, com inibição máxima de $69 \pm 2\%$ para a dose de 300 mg/kg, na 3ª h. Neste mesmo período, o antiinflamatório dexametasona diminuiu em $60 \pm 5\%$ o edema.

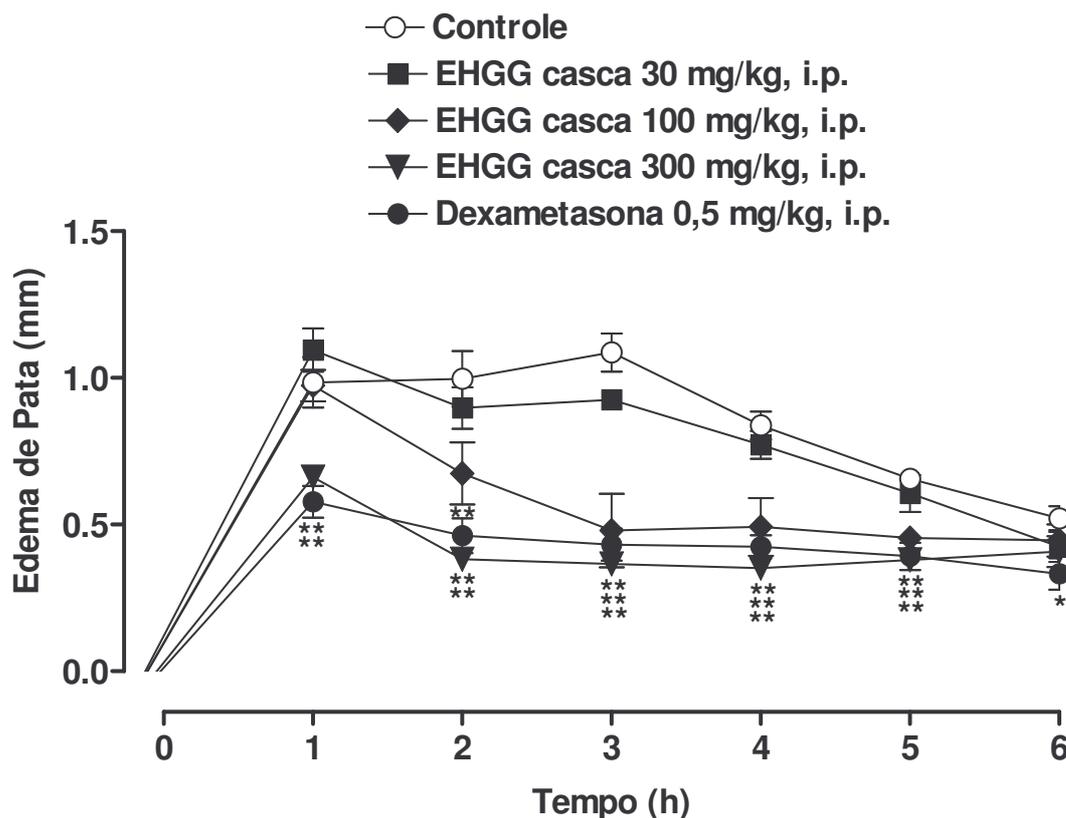


Figura 8: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das cascas, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados com o EHGG das cascas nas doses indicadas, ou veículo (controle), ou dexametasona e após 30 min receberam a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção da carragenina. Os pontos representam a média de 4 – 8 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística **P < 0,01 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

O efeito da administração intraperitoneal do EHGG das sementes 30 min antes, sobre o edema produzido pela administração de carragenina (300 µg/sítio), está demonstrado na figura 9. O EHGG das sementes exerceu efeito anti-edematogênico dependente da dose, da segunda à quarta hora. Entretanto, não atingiu 50% de inibição da resposta, sendo que a inibição máxima obtida foi de $41 \pm 11\%$ para a dose de 300 mg/kg na 3ª h. Também é possível observar que a dexametasona (0,5 mg/kg), administrada pela via intraperitoneal, mantém sua ação antiinflamatória, representada pela inibição do edema de pata induzido pela carragenina, que chega a $50 \pm 6\%$ na terceira hora.

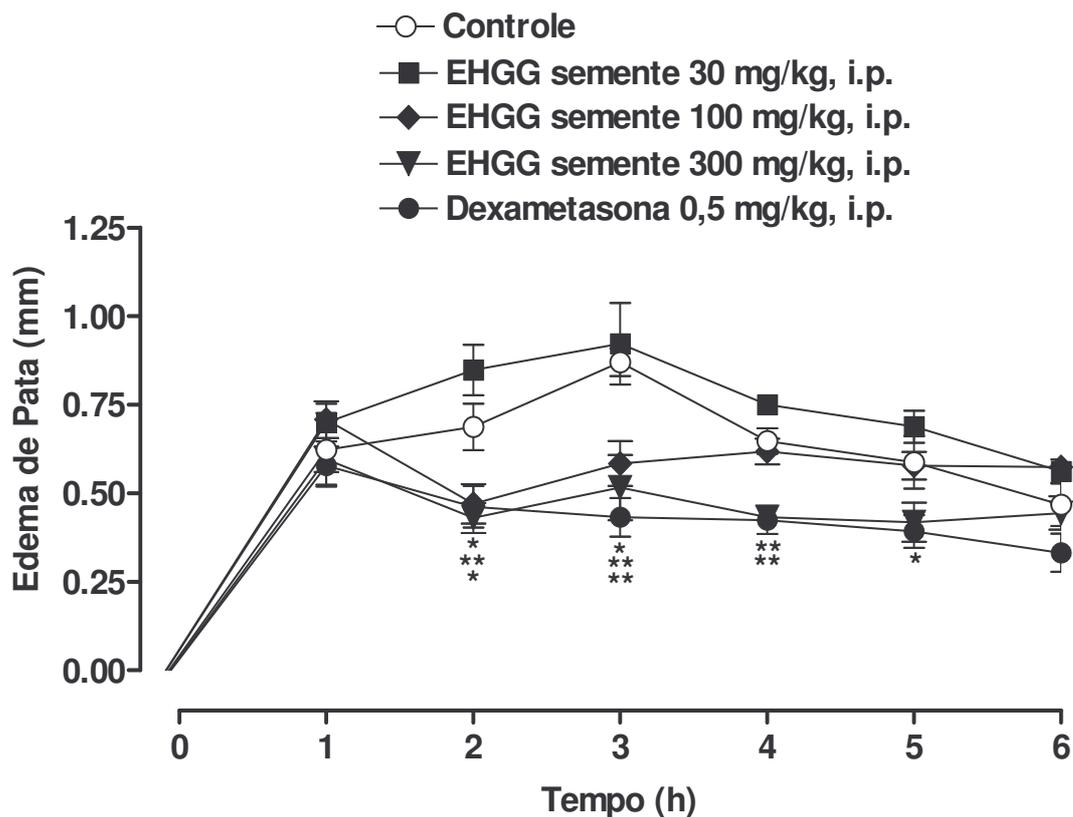


Figura 9: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das sementes, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das sementes nas doses indicadas, veículo (controle), ou dexametasona, e após 30 min receberam a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção da carragenina. Os pontos representam a média de 4 – 8 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística **P < 0,01 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Dunnett).

4.3 Efeito da administração intraperitoneal do EHGG, produzido a partir da folha, casca e semente, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), em patas de camundongos submetidos ao edema pela carragenina.

A figura 10 mostra que o EHGG produzido a partir das folhas influencia a atividade da enzima mieloperoxidase em patas estimuladas com a carragenina (300 µg/sítio). Seis horas após a injeção de carragenina, o tratamento i.p. com EHGG das folhas reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase nas três doses testadas (30, 100 e 300 mg/kg). A inibição máxima da atividade enzimática obtida foi de 41 ± 6 %, para a dose de 30 mg/kg quando comparado com o grupo controle (C, tratado somente com carragenina). Entretanto, essa resposta inibitória do EHGG das folhas não apresentou um padrão dependente da dose administrada. A dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) reduziu a atividade da MPO em 62 ± 1 %, aproximando-a dos níveis basais (controle negativo - B).

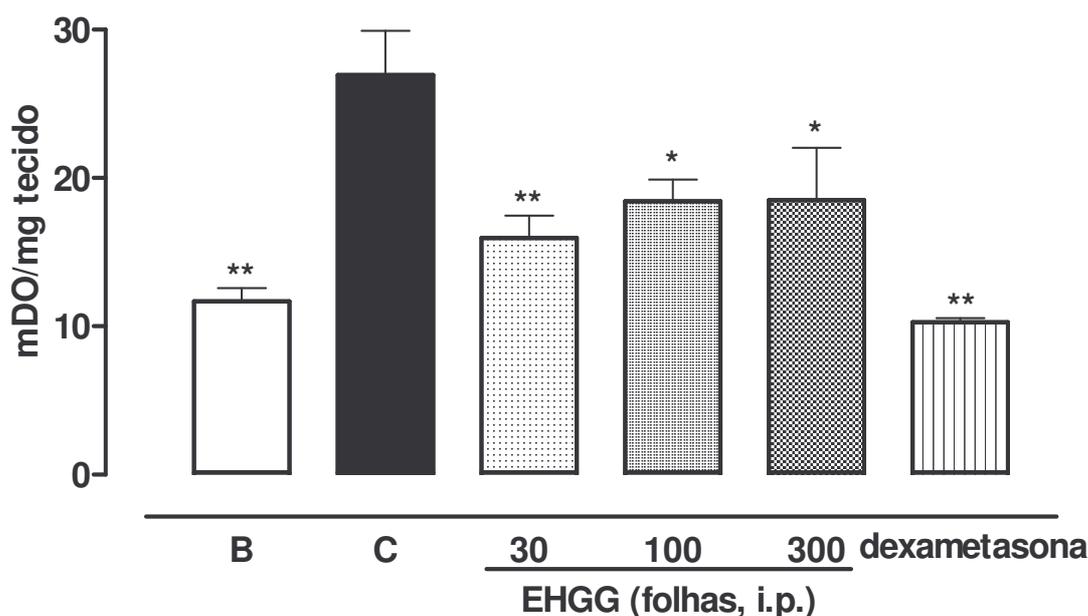


Figura 10: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em patas, 6 h após a indução de edema pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das folhas nas doses indicadas, veículo (C), ou dexametasona, via i.p., e após 30 min receberam a administração intraplantar de carragenina (300 µg/sítio), com exceção do grupo cujas patas foram retiradas para medida basal da atividade enzimática (B). A atividade enzimática foi dosada por espectrofotometria a 620 nm. Os pontos representam a média de 5 patas e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística **P < 0,01 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Dunnett).

O tratamento i.p. dos animais com EHGG produzido a partir das cascas também promoveu alteração na atividade da mieloperoxidase nas patas submetidas ao edema com carragenina (300 µg/sítio). Os resultados apresentados na figura 11 demonstram que o EHGG das cascas (i.p.) foi capaz de diminuir a atividade da enzima MPO, 6 h após o estímulo, em $45 \pm 6\%$ somente na dose de 300 mg/kg. A dexametasona manteve sua ação antiinflamatória, inibindo a enzima em $62 \pm 1\%$.

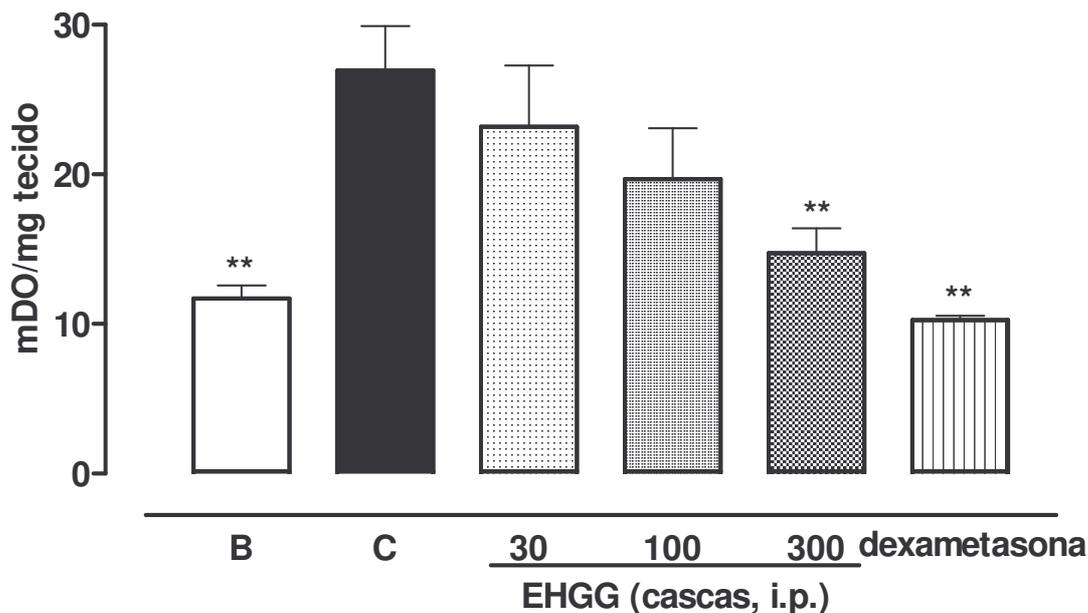


Figura 11: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das cascas, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em patas, 6 h após a indução de edema pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das cascas nas doses indicadas, veículo (C), ou dexametasona, via i.p., e após 30 min receberam a administração intraplantar de carragenina (300 $\mu\text{g}/\text{sítio}$), com exceção do grupo cujas patas foram retiradas para medida basal da atividade enzimática (B). A atividade enzimática foi dosada por espectrofotometria a 620 nm. Os pontos representam a média de 5 patas e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística $**P < 0,01$ foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Dunnett).

Na figura 12 observa-se que o tratamento dos animais com o EHGG das sementes (i.p.), no modelo de edema de pata induzido pela carragenina, foi capaz de promover uma pequena mudança no aumento da atividade da enzima mieloperoxidase causada pela inflamação. A dose de 300 mg/kg do extrato inibiu $23 \pm 6 \%$ da atividade da MPO, enquanto a dexametasona (0,5 mg/kg) diminuiu $72 \pm 1 \%$ da resposta.

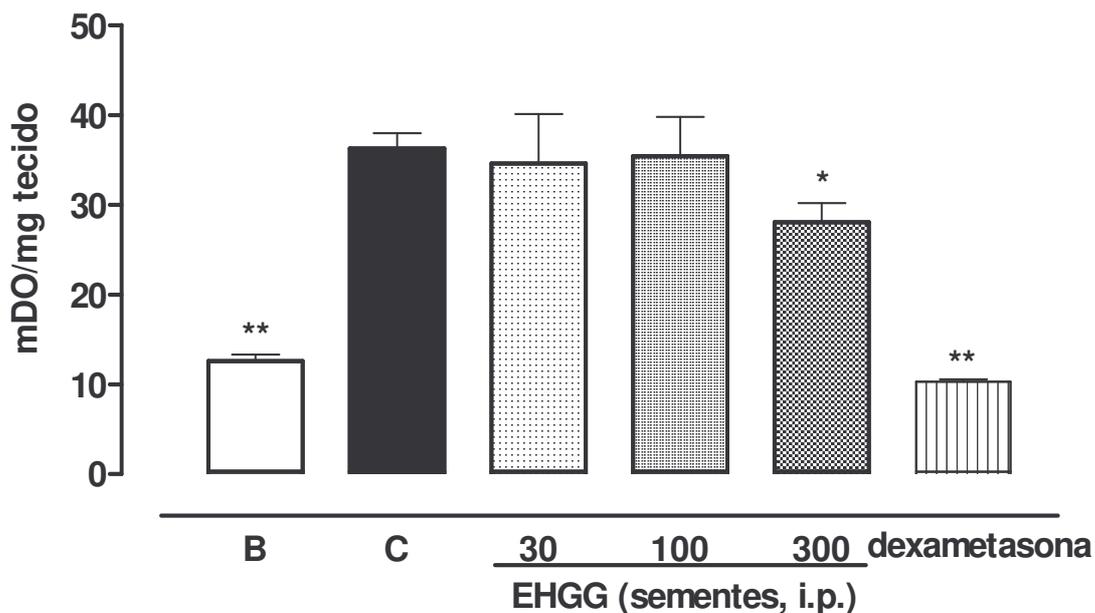


Figura 12: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das sementes, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em patas, 6 h após a indução de edema pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das sementes nas doses indicadas, veículo (C), ou dexametasona, via i.p., e após 30 min receberam a administração intraplantar de carragenina (300 µg/sítio), com exceção do grupo cujas patas foram retiradas para medida basal da atividade enzimática (B). A atividade enzimática foi dosada por espectrofotometria a 620 nm. Os pontos representam a média de 4 - 6 patas e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística $**P < 0,01$ foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Dunnett).

4.4 Efeito da incubação do EHGG *in vitro*, produzido a partir da folha, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) de patas de camundongos submetidos ao edema pela carragenina.

As amostras de tecidos inflamados, ou seja, com grande quantidade de MPO, foi obtida com uma injeção intraplantar de carragenina (300 µg/sítio), sem que os animais recebessem qualquer tratamento prévio. As patas foram colhidas na 4^a h do edema e preparadas conforme o protocolo descrito anteriormente. As amostras foram separadas em dois grupos: grupo controle, com patas sem estímulo inflamatório; e grupo estimulado, patas tratadas com carragenina. Para realização do teste foram adicionadas em cada poço da placa 30 µL/poço de cada amostra, e em seguida foi acrescentado o EHGG das folhas em quatro concentrações (1, 10, 30 e 100 µg/mL) em cada grupo de amostras. Após a adição do extrato, fez-se pausa para incubação de 15 min e procedeu-se a continuidade da metodologia conforme o protocolo, com a adição de peróxido de hidrogênio e de TMB. Observa-se na figura 13 que a incubação do EHGG produzido a partir das folhas, em todas as concentrações testadas, 1, 10, 30 ou 100 µg/mL, não foi capaz de alterar a atividade da enzima mieloperoxidase quando comparado com o grupo carragenina somente.

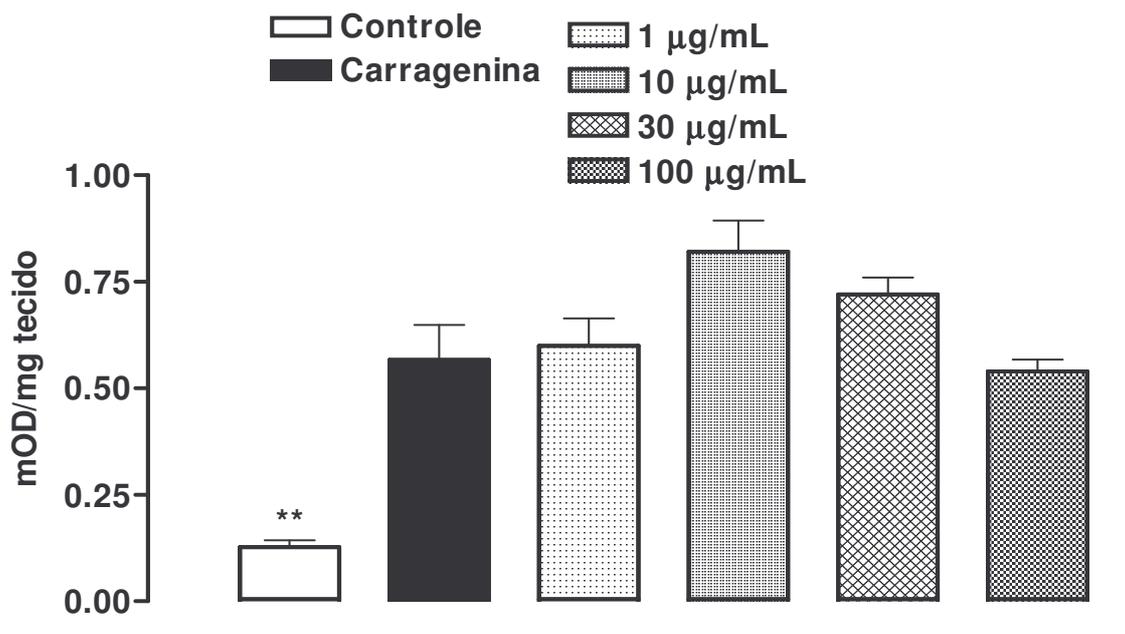


Figura 13: Efeito da incubação do EHGG das folhas, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em patas, 4 h após a indução de edema pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais receberam a administração intraplantar de carragenina (300 µg/sítio), com exceção do grupo cujas patas foram retiradas para medida basal da atividade enzimática (Controle). As amostras de cada grupo foram reunidas, plaqueadas e incubadas, durante 15 min, com as concentrações citadas. A atividade enzimática foi dosada por espectrofotometria a 620 nm. Os pontos representam a média de 4 poços e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística $**P < 0,01$ foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo carragenina (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

4.5 Avaliação curso temporal do efeito do EHGG das folhas, sobre a resposta máxima do edema de pata induzido pela carragenina.

A figura 14 demonstra o tempo-resposta do EHGG produzido a partir das folhas sobre o edema de pata induzido pela carragenina na 4^a hora. O EHGG das folhas, na dose de 300 mg/kg, quando administrado pela via intraperitoneal, é capaz de reduzir o edema da carragenina quando administrado até 4 horas antes da injeção do agente flogístico (-4), e mantém esta inibição se injetado até duas horas após a carragenina (+2). O extrato inibiu 33 ± 13 % do edema ao ser administrado 4 horas antes da injeção da carragenina, esta inibição tornou-se crescente, atingindo seu máximo de 70 ± 2 % 1 h antes da indução do edema. O extrato inibiu então, 58 ± 4 % da resposta quando aplicado 30 min antes do estímulo, 30 ± 7 % se administrado no mesmo momento que a carragenina (tempo zero) e 66 ± 6 % se administrado 30 min depois. A Imax do extrato ocorreu quando sua aplicação foi 1 hora após a injeção da carragenina, inibindo deste modo 72 ± 10 % da resposta edematogênica. O extrato exerceu atividade inibitória sobre o pico edematogênico se administrado até 2 horas após a carragenina (46 ± 11 %), não apresentando atividade se aplicado 3 horas após.

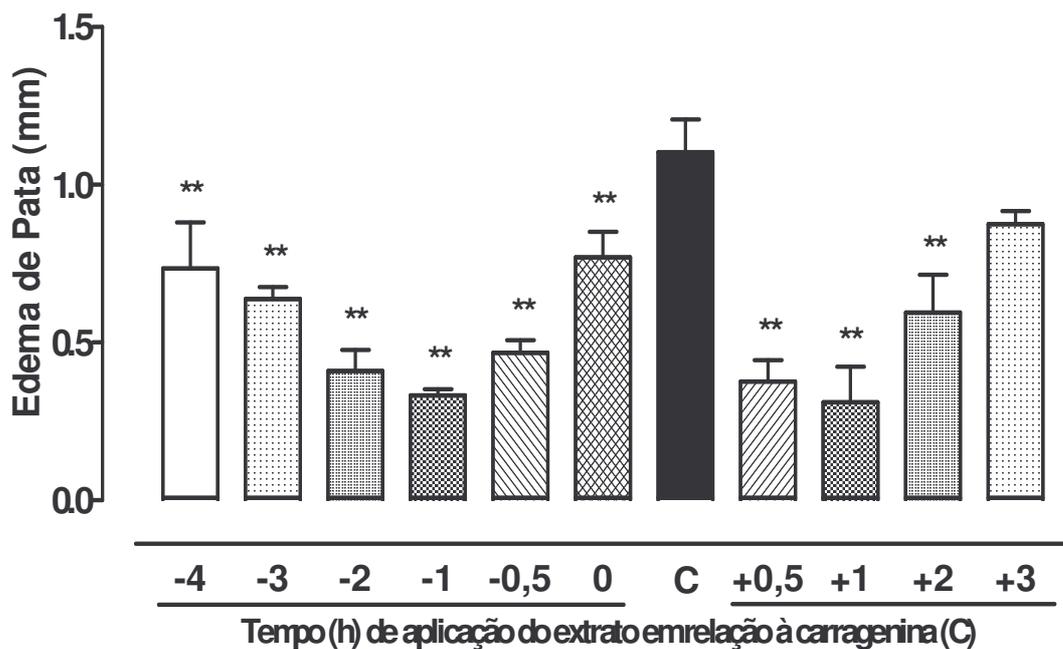


Figura 14: Duração do efeito do tratamento intraperitoneal com o EHG das folhas, sobre a 4ª hora do edema induzido pela administração intraplantar de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHG das folhas (300 mg/kg) 4 (-4), 3 (-3), 2 (-2), 1 (-1) hora ou 30 min (-0,5) antes da administração intraplantar de carragenina, ou no mesmo momento (0), ou ainda 30 min (+0,5), 1 (+1), 2 (+2) ou 3 (+3) horas após a carragenina. Com exceção do grupo que recebeu apenas carragenina (C). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 4 horas após a injeção da carragenina. Os pontos representam a média de 4 – 8 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística $**P < 0,01$ foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

4.6 Análise histológica do efeito do EHGG das folhas, sobre o infiltrado celular de patas submetidas ao edema induzido pela carragenina.

Conforme mostra a Figura 15, 4 h após a injeção intraplantar de carragenina, os cortes histológicos das patas dos camundongos demonstram intensa infiltração celular (polimorfonucleares) na derme além de edema (fig. 15 – B). A camada mais escura, na superfície das imagens representadas em menor aumento, é a epiderme, logo abaixo dela, em tons rosados, está a derme, onde o edema é representado pelo aumento na sua espessura, e os pontos escuros são leucócitos polimorfonucleares. A infiltração celular foi reduzida pela administração do EHGG das folhas (300 mg/kg, i.p., fig. 15 - D) ou de dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., fig. 15 - C), administrados 30 min antes do estímulo, apresentando uma resposta semelhante à observada no corte da pata sem estímulo inflamatório, basal (A).

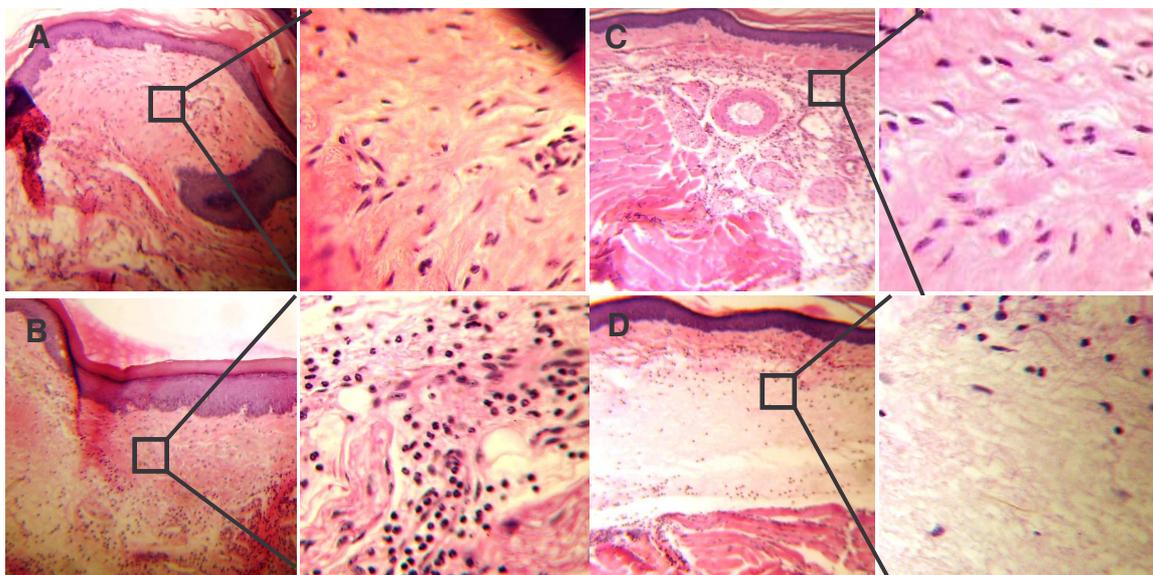


Figura 15: Análise histológica do efeito do EHGG das folhas sobre o infiltrado leucocitário em patas submetidas ao edema pela carragenina. Cortes transversais de patas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x com seu correspondente em 400x) 4 h após a injeção de carragenina (300µg/sítio). **(A)** basal, **(B)** controle (carragenina), **(C)** dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), **(D)** EHGG das folhas (300 mg/kg, i.p.). Os aumentos indicam polimorfonucleares na derme.

4.7 Efeito do tratamento com o EHGG das folhas sobre o edema de pata induzido por diferentes mediadores, em camundongos.

A resposta inflamatória produzida pela injeção intraplantar de carragenina leva à liberação de uma série de mediadores inflamatórios, a fase inicial envolve o influxo celular associado à liberação de histamina e serotonina, que é seguida pela produção de bradicinina e prostaglandinas. Todos estes mediadores produzem inflamação quando injetados por via subcutânea (ARYA e KUMAR, 2005). Para verificar o envolvimento de algumas vias de mediadores inflamatórios envolvidos na resposta antiinflamatória do EHGG, fez-se a avaliação do efeito do extrato sobre o edema induzido por diferentes mediadores.

O efeito do EHGG das folhas sobre o edema induzido pela administração intraplantar de histamina (100 $\mu\text{g/sítio}$), está demonstrado na figura 16. O EHGG, administrado 30 min antes (300 mg/kg, i.p.), foi capaz de reduzir o edema causado pela histamina. O valor de I_{max} do edema foi de $42 \pm 7\%$ quando medido 15 min após a injeção da histamina. Sendo que, o extrato manteve sua inibição até 30 min após a aplicação do agente flogístico, quando reduziu em $34 \pm 9\%$ a formação do edema.

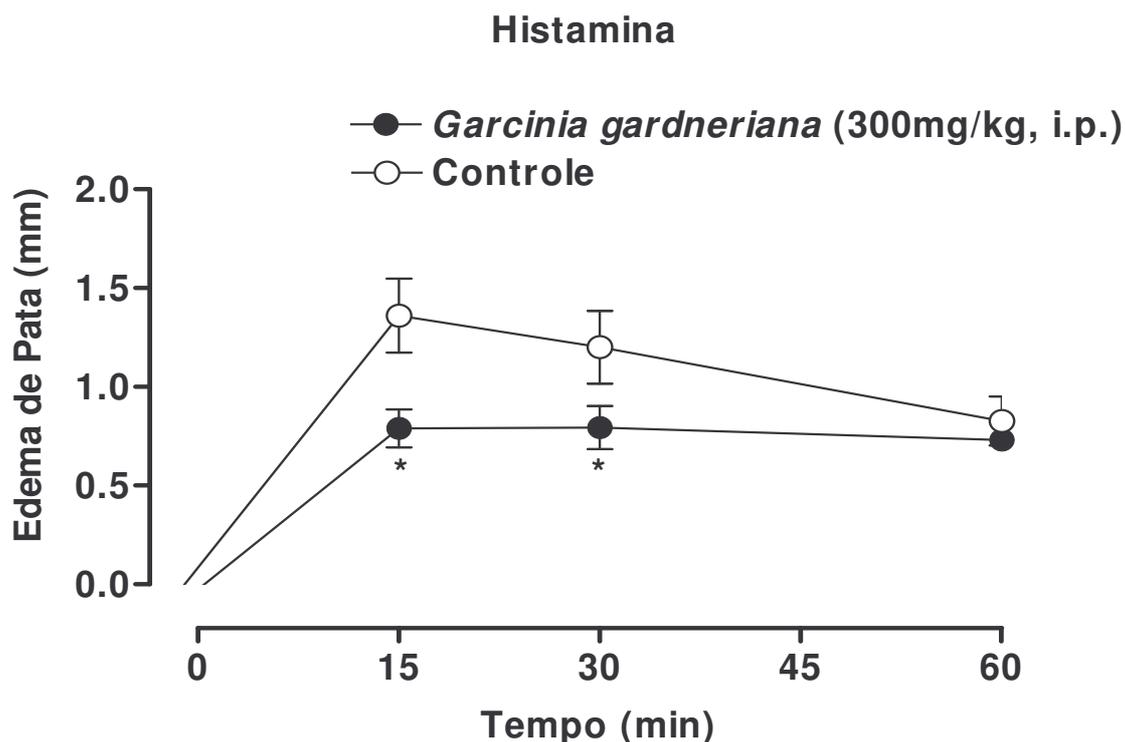


Figura 16: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de histamina em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das folhas (300 mg/kg), ou veículo (controle) e após 30 min receberam a injeção intraplantar de histamina (100 µg/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 15, 30 e 60 min após a injeção da histamina. Os pontos representam a média de 4 – 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística *P < 0,05 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle histamina (teste T de Student, não pareado).

A figura 17 demonstra a ação do EHGG das folhas sobre o edema de pata provocado pela administração de bradicinina. A aplicação intraperitoneal do EHGG das folhas, na dose de 300 mg/kg, 30 min antes, reduziu o edema gerado pela injeção intraplantar de bradicinina (3 nmol/sítio). A redução do edema foi de 43 ± 11 %, quando medido 15 min após a injeção do agente, tempo da maior resposta edematogênica, e de 48 ± 16 % aos 30 min. No entanto, o extrato não alterou o edema no momento de sua última medida (60 min).

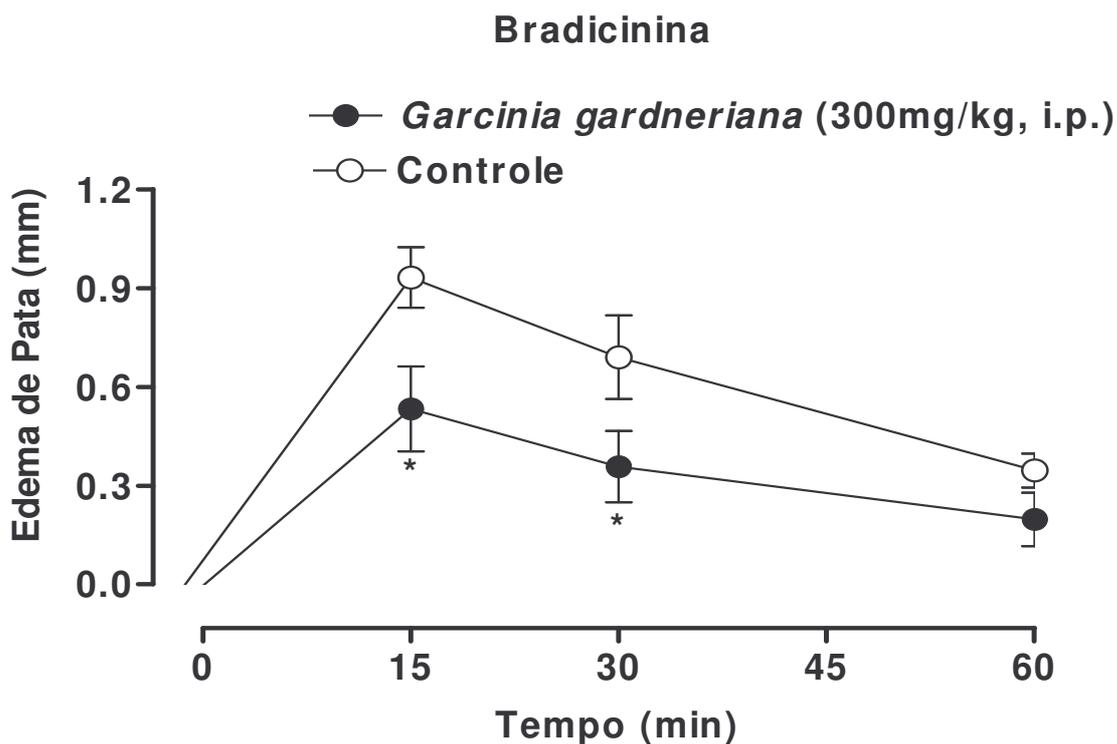


Figura 17: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de bradicinina, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das folhas (300 mg/kg), ou veículo (controle) e após 30 min receberam a injeção intraplantar de bradicinina (3 nmol/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 15, 30 e 60 min após a injeção da bradicinina. Os pontos representam a média de 4 – 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística *P < 0,05 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle bradicinina (teste T de Student, não pareado).

O EHGG das folhas também foi testado sobre o edema de pata induzido pela PGE₂. Na figura 18 é possível observar que o EHGG das folhas na dose de 300 mg/kg, via intraperitoneal, promoveu importante redução do edema de pata promovido pela PGE₂ (3 nmol/sítio), e esta redução acompanhou todas as medidas do edema. A inibição do edema 30 min após a injeção intraplantar (i.pl.) da PGE₂, foi de 35 ± 12 %, aos 60 min o extrato reduziu em 58 ± 13 % e, na última medida, 90 min depois da aplicação do agente flogístico, o EHGG atingiu a I_{max} de 80 ± 3 %.

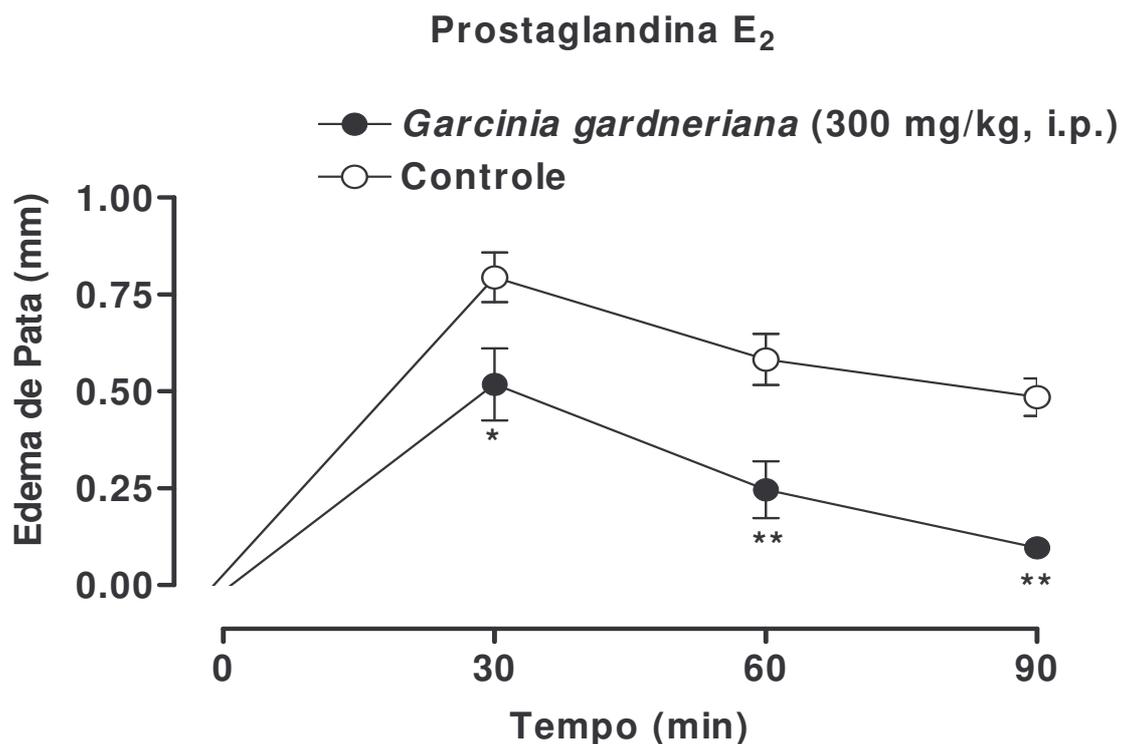


Figura 18: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de prostaglandina E₂ (PGE₂), em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das folhas (300 mg/kg), ou veículo (controle) e após 30 min receberam a injeção intraplantar de PGE₂ (3 nmol/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 30, 60 e 90 min após a injeção da PGE₂. Os pontos representam a média de 4 – 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística **P < 0,01 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle PGE₂ (teste T de Student, não pareado).

Outro estímulo edematogênico sobre o qual o EHGG das folhas exerceu atividade foi a substância P (SP). A figura 19 demonstra que o EHGG produzido a partir das folhas (300 mg/kg, i.p.), reduziu o edema promovido pela injeção i.pl. de SP (30 nmol/sítio). O EHGG das folhas, administrado 30 min antes, não alterou o edema medido 15 min após o estímulo inflamatório, mas inibiu em $24 \pm 7 \%$ a resposta edematogênica da SP no tempo de 30 min, e reduziu em $33 \pm 7 \%$ o edema, 45 min após a injeção do agente edematogênico.

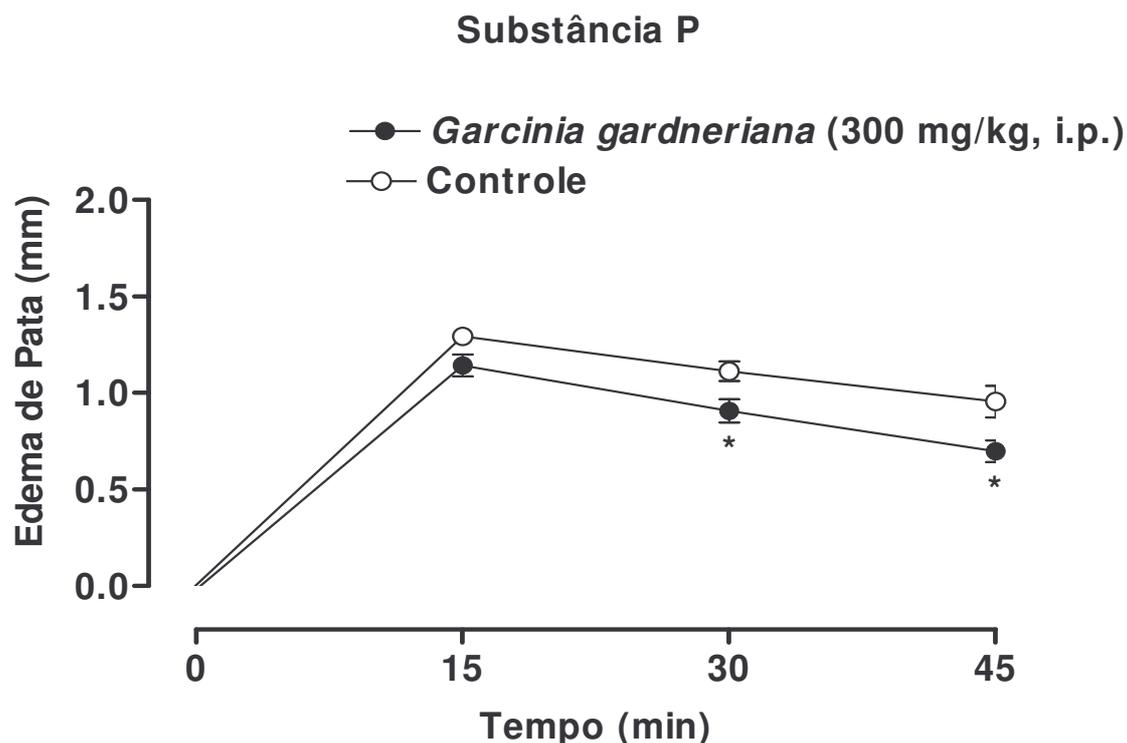


Figura 19: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de substância P, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das folhas (300 mg/kg), ou veículo (controle) e após 30 min receberam a injeção intraplantar de substância P (30 nmol/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 15, 30 e 45 min após a injeção da substância P. Os pontos representam a média de 4 – 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística * $P < 0,05$ foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle substância P (teste T de Student, não pareado).

O EHGG produzido a partir das folhas apresentou um efeito sutil sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80 em camundongos (figura 20). Após a injeção do composto 48/80 (100 ng/sítio), a resposta edematogênica foi avaliada a cada 15 min durante 45 min e a administração do extrato (300 mg/kg, i.p., 30 min antes), promoveu uma pequena redução de $15 \pm 4 \%$ no edema medido em 30 min. O EHGG das folhas não alterou o edema provocado pelo 48/80 nos demais tempos avaliados.

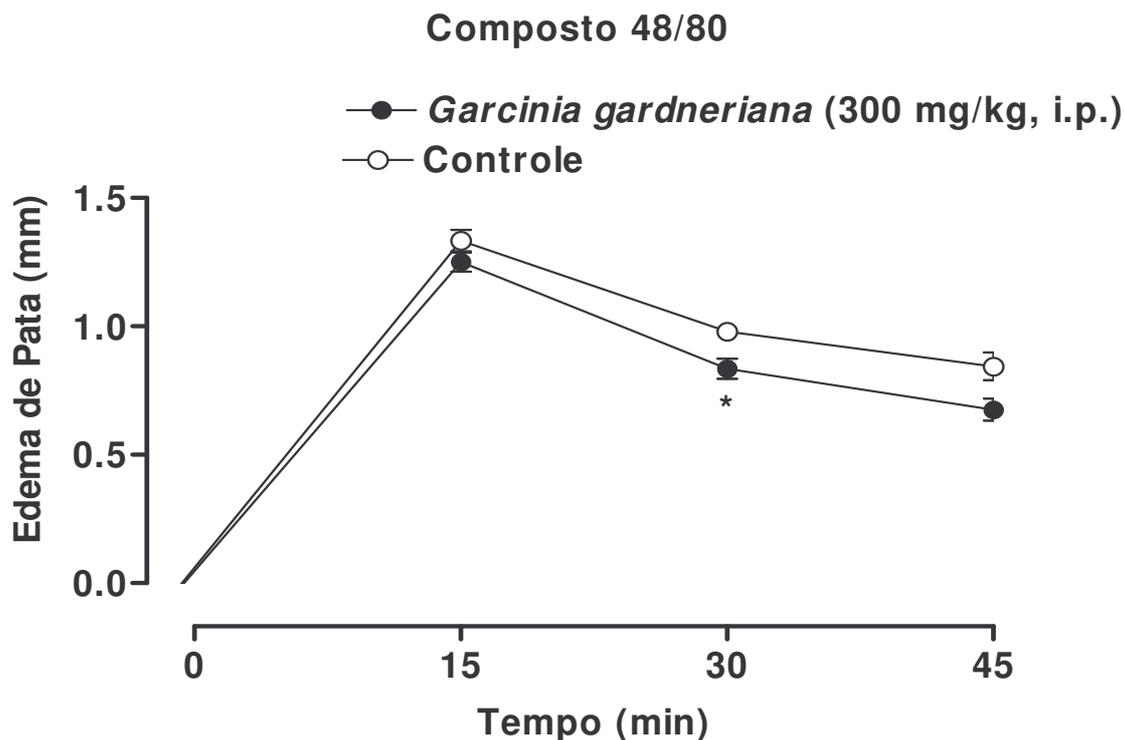


Figura 20: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração do composto 48/80, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das folhas (300 mg/kg), ou veículo (controle) e após 30 min receberam a injeção intraplantar de 48/80 (100 ng/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 15, 30 e 45 min após a injeção do 48/80. Os pontos representam a média de 4 – 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística * $P < 0,05$ foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle 48/80 (teste T de Student, não pareado).

Foi também estudado o efeito do EHGG das folhas sobre o edema induzido pela administração intraplantar de ácido araquidônico (AA) (1% em tampão carbonato 0,2 M/sítio). Na figura 21 observa-se que o tratamento dos animais com o extrato, na dose de 300 mg/kg (i.p., 30 min antes), não foi capaz de influenciar a resposta edematogênica induzida pelo AA, avaliada 1 h após a injeção do agente flogístico.

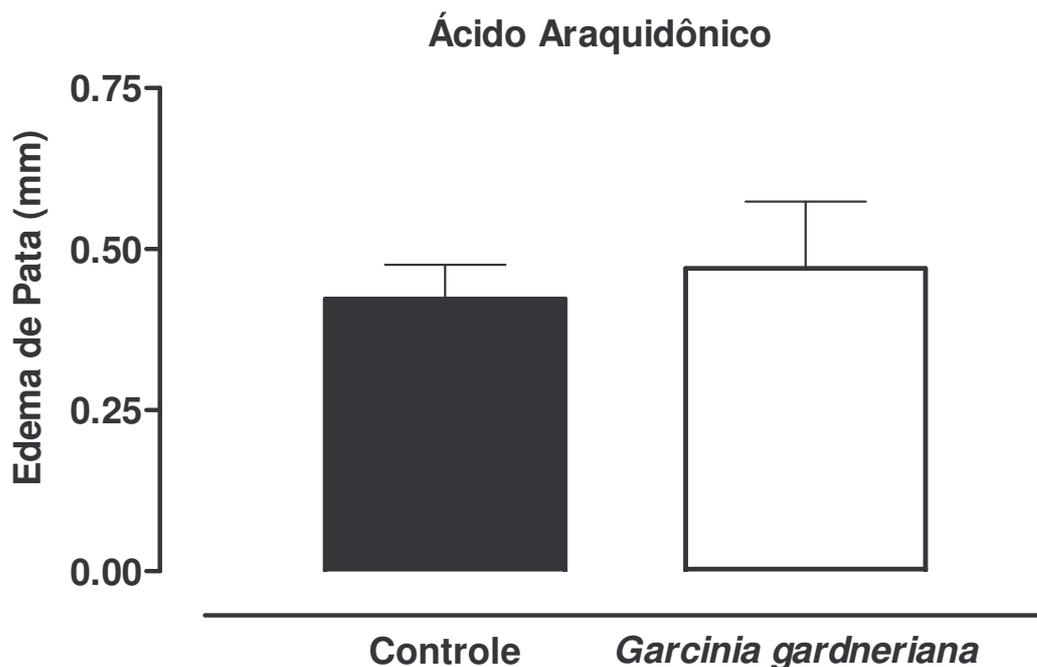


Figura 21: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de ácido araquidônico, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das folhas (300 mg/kg), ou veículo (controle) e após 30 min receberam a injeção intraplantar de ácido araquidônico (1 %/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 1 h após a injeção do ácido araquidônico. Os pontos representam a média de 4 – 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística *P < 0,05 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle (teste T de Student, não pareado).

4.8 Efeito do tratamento com o EHGG das folhas sobre os edemas induzidos pelo éster de forbol 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)

Edemas de pata e de orelha foram induzidos com a aplicação TPA, com a intenção de verificar o efeito do EHGG das folhas sobre outro tipo de estímulo inflamatório. A figura 22 demonstra que o EHGG preparado a partir das folhas (300 mg/kg, 30 min antes), quando administrado pela via intraperitoneal, foi capaz de alterar o edema de pata causado pela injeção intraplantar de TPA (50 pmol/sítio), promovendo uma inibição significativa de $33 \pm 6 \%$. O efeito do EHGG das folhas também foi avaliado sobre o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA. O tratamento prévio dos animais com o EHGG das folhas (300 mg/kg, i.p., 30 min antes) promoveu uma pequena, mas significativa redução de $18 \pm 7 \%$ do edema de orelha induzido pela aplicação do TPA (2,5 μ g/sítio) (figura 23).

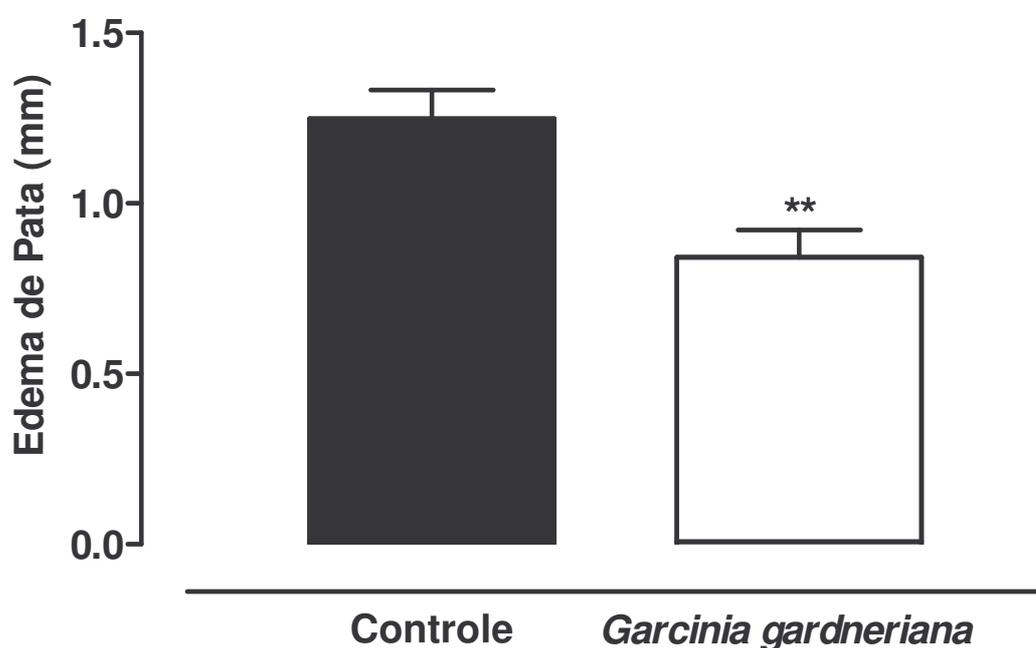


Figura 22: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela administração de TPA, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das folhas (300 mg/kg), ou veículo (controle) e após 30 min receberam a injeção intraplantar de TPA (50 pmol/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 1 h após a injeção do TPA. Os pontos representam a média de 4 – 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística **P < 0,01 foi

indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle (teste T de Student, não pareado).

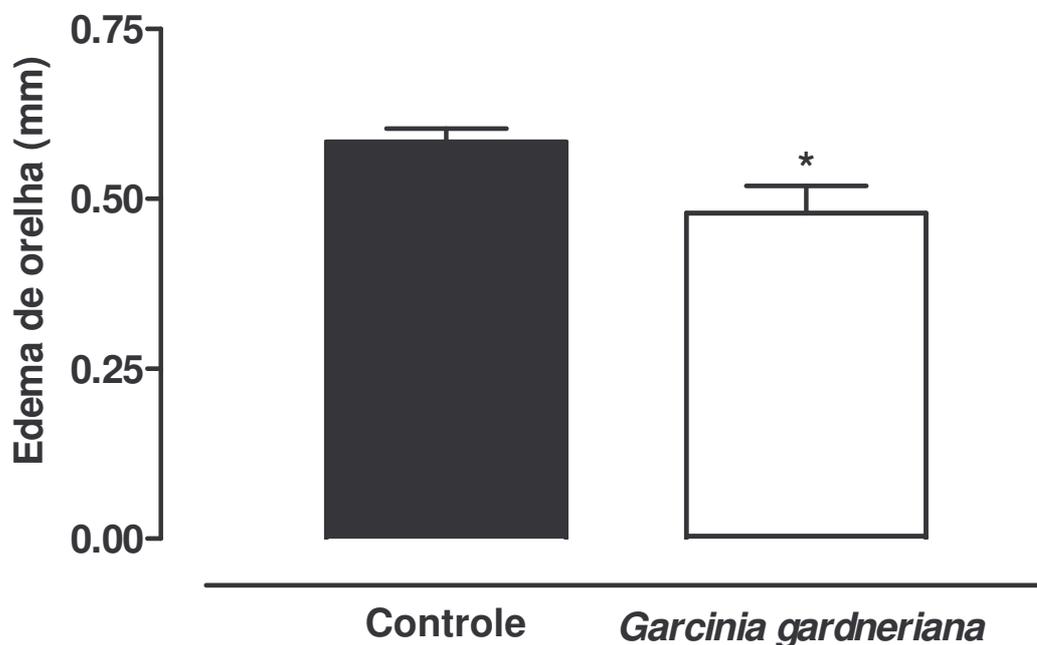


Figura 23: Efeito do tratamento intraperitoneal com o EHGG das folhas, sobre o edema causado pela aplicação tópica de TPA, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com o EHGG das folhas (300 mg/kg), ou veículo (controle) e após 30 min receberam a aplicação tópica de TPA (2,5 µg/sítio) na orelha direita. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da orelha, medida com um micrômetro, antes e 6 h após a aplicação do TPA. Os pontos representam a média de 4 – 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística *P < 0,05 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle (teste T de Student, não pareado).

4.9 Efeito dos biflavonóides extraídos do EHGG das folhas sobre o edema de pata induzido pela carragenina

A avaliação de uma possível atividade antiinflamatória dos compostos biflavonóides extraídos do EHGG das folhas, fukugetina e GB-2a, foi verificada no modelo de edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. Observa-se na figura 24 – A, que o biflavonóide fukugetina, administrado pela via intraperitoneal nas diferentes doses (10, 30 e 100 mg/kg), foi capaz de alterar o edema induzido pela carragenina aos 30 min, na quarta e quinta hora após sua indução. Na dose de 10 mg/kg, o fukugetina reduziu o edema da pata na quarta e quinta hora, em 38 ± 4 e 26 ± 5 %, respectivamente; enquanto a dose de 100 mg/kg promoveu uma redução de 19 ± 0 % na quinta hora do edema. A dose de 30 mg/kg não exerceu quaisquer efeitos sobre o edema durante as seis horas de avaliação.

Os resultados apresentados na é figura 24 – B mostram que o tratamento com o biflavonóide GB-2a (10, 30 e 100 mg/kg, i.p., 30 min antes) apresentou importante efeito sobre o edema induzido pela carragenina. O GB-2a inibiu o edema durante as seis horas de avaliação, de forma dependente da dose. O valor médio da DI_{50} foi de 78,36 (47,25 – 129,98) mg/kg, e apresentou a inibição máxima de $54 \pm 3\%$ na quinta hora de edema, para a dose de 100 mg/kg.

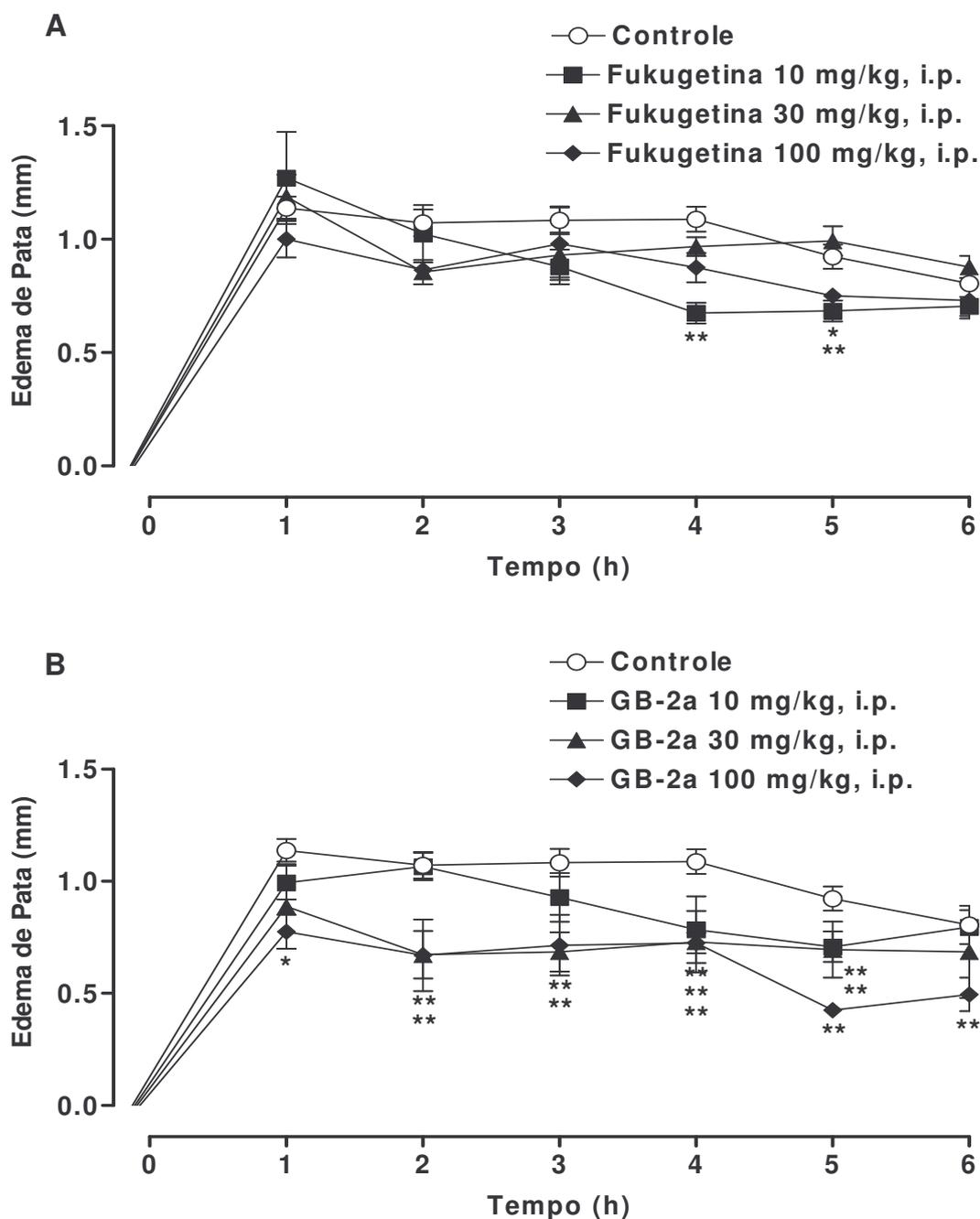


Figura 24: Efeito do tratamento intraperitoneal com os biflavonóides fukugetina e GB-2a, sobre o edema causado pela administração de carragenina, em camundongos. Os animais foram tratados, via intraperitoneal, com fukugetina (A), ou GB-2a (B) nas doses indicadas, ou veículo (controle), e após 30 min receberam a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/sítio). O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata, medida com um micrômetro, antes e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção da carragenina. Os pontos representam a média de 2 – 10 animais e as barras verticais o E.P.M. Na análise estatística **P < 0,01 foi indicativo de significância, quando comparado ao grupo controle carragenina (Teste de comparações múltiplas de Dunnett).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Um estudo sobre o uso popular de plantas medicinais na floresta tropical brasileira revelou que, de 290 preparados vegetais de 114 plantas medicinais, 28% são utilizados em situações que incluem componentes inflamatórios, como moléstias do sistema respiratório, estados febris e reumatismo (DI STASI *et al.*, 2002). Compostos derivados de plantas possuem valor histórico como fontes de agentes antiinflamatórios. Desta forma, a busca por novas drogas que interfiram efetivamente com os processos inflamatórios é de grande importância (CALIXTO *et al.*, 2003; 2004).

Plantas, assim como microorganismos, são fontes biológicas e químicas com cerca de 250.000 a 500.000 espécies presentes no planeta. A frequência alarmantemente rápida com que espécies têm entrado em extinção, em parte devido à destruição ambiental, não apenas outorga certa urgência pela busca de fármacos derivados de plantas, mas também chama à questão da capacidade de se adquirir quantidades suficientes de uma planta para sustentar o programa de desenvolvimento. Como diversidade química é um fator importante para a descoberta de novos medicamentos, depara-se, em essência, com uma situação de “agora ou nunca” (BORRIS, 1996).

Atualmente, de todos os fármacos disponíveis na terapêutica, em torno de 25 – 30% são produzidos a partir de produtos naturais (plantas, microorganismos e animais) ou são derivações destes produtos. Evidências recentes de companhias farmacêuticas mostram que, para algumas doenças complexas, os produtos naturais representam uma fonte extremamente valiosa para a produção de novas entidades químicas, visto que são compostos por estruturas químicas privilegiadas, selecionadas por milhões de anos de evolução (CALIXTO, 2005). Entre estas ricas fontes de novas entidades químicas está a família Clusiaceae. Esta família do reino vegetal é composta por inúmeros membros com vasto espectro de atividades biológicas, incluindo o gênero *Hypericum* que compreende aproximadamente 400 espécies (ROBSON, 1990). É uma família que possui mais de 100 compostos isolados de cerca de 20 espécies diferentes, com atividades biológicas distintas, especialmente antiinflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, antivirais e antidepressivos (GUSTAFSON *et al.*, 1992; ROCHA *et al.*, 1994; MINAMI *et al.*,

1996; VIANA *et al.*, 2003; SUFFREDINI *et al.*, 2006). *Rheedia*, outro gênero da família Clusiaceae, é muito comumente usado em várias desordens na medicina popular, incluindo constipação, reumatismo, inflamação e dor (CÔRREA, 1984; BITTAR *et al.*, 2000). A literatura mostra que as plantas deste gênero são ricas em flavonóides e biflavonóides, benzofenonas, xantonas, triterpenos e esteróides (DELLE MONACHE *et al.*, 1983; 1984).

Neste contexto, a *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi, também conhecida como *Rheedia gardneriana* Planchon & Triana, possui, entre suas indicações populares, o uso em quadros inflamatórios. Estudos feitos com seus extratos e compostos isolados têm confirmado tais indicações. Foi observada ação inibitória do extrato hidroalcoólico, produzido a partir das folhas, sobre o modelo de pleurisia induzida por carragenina em ratos, havendo diminuição tanto do exudato como da infiltração de neutrófilos (GUIMARÃES *et al.*, 1996b). Guimarães e colaboradores (1996a) observaram ação vasodilatadora sobre aorta isolada de rato, enquanto em outro trabalho, foi verificada a eficácia do extrato das folhas de *G. gardneriana* sobre a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, quando administrado tanto por via oral quanto intraperitoneal (LUZZI e GUIMARÃES, 1995). O extrato hidroalcoólico também demonstrou efeito inibitório sobre a infiltração de eosinófilos para a cavidade pleural de ratos sensibilizados com ovoalbumina. E sobre o exudato pleural induzido por serotonina, histamina e bradicinina (DA SILVA e GUIMARÃES, 1997).

A investigação química do gênero *Rheedia* revelou, em diversas espécies, a existência dos biflavonóides dentre inúmeros outros compostos. A análise da casca das raízes da *Rheedia benthamiana* Pl. Triana, *R. brasiliensis* (Martins) e *R. gardneriana* Pl. Triana, levou ao isolamento de muitas xantonas e dos biflavonóides volkensiflavona, fukugetina e GB-2a que, da mesma forma, estão presentes nos frutos da *Rheedia madruno* (HBK) Planchon & Triana, juntamente com o GB-1a (BOTTA *et al.*, 1984). Conjuntamente, estes compostos já eram conhecidos como biflavonóides da *Garcinia*, figura 3, antes que o gênero *Rheedia* fosse englobado por esse gênero. Estudos com os biflavonóides isolados das folhas da *G. gardneriana* demonstraram ação analgésica da volkensiflavona, fukugesida, do GB-2a, fukugetina (também conhecido como moreloflavona), e GB-2a-II-4'-OMe em relação à segunda fase

do teste da formalina (dor inflamatória) (CECHINEL FILHO *et al.*, 2000; LUZZI *et al.*, 1997; DA SILVA e GUIMARÃES, 1997). No mesmo modelo, o fukugetina apresentou ação antiedematogênica e bloqueou a resposta anafilática induzida pela administração endovenosa de ovoalbumina (DA SILVA e GUIMARÃES, 1997). Ainda, o 13-naringenina-118-4'-OMe-eriodictiol (GB-2a-11-4'-Ome), demonstrou efeitos analgésicos, dependentes da dose, no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (CECHINEL FILHO *et al.*, 2000). Tanto a pleurisia, como a nocicepção por formalina (2ª fase) são modelos experimentais com capacidade de identificar uma provável atividade antiinflamatória de uma substância. Assim, com base nesses resultados obtidos justifica-se avaliar o potencial antiinflamatório dos extratos da *Garcinia gardneriana* e alguns de seus compostos e outro modelo inflamatório em animais, como a carragenina.

A resposta inflamatória aguda é caracterizada por um aumento na permeabilidade vascular e no infiltrado celular, levando à formação de edema como resultado do extravasamento de fluido e proteínas e acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório. Há muitos mediadores envolvidos na inflamação: histamina, serotonina, BK, PG e o óxido nítrico, entre outros, os quais são produzidos ou liberados por diferentes tipos celulares, como leucócitos, células endoteliais e células nervosas sensoriais, e estão envolvidos no aumento da permeabilidade vascular (ARYA e KUMAR, 2005; POSADAS *et al.*, 2004).

O modelo de resposta inflamatória induzida pela injeção de carragenina na pata de ratos foi introduzido em 1962 (WINTER *et al.*, 1962), e em 1969 foi adaptado para camundongos (LEVY, 1969). Desde então, este modelo tem sido amplamente usado para a triagem de compostos com potencial antiinflamatório (ARYA e KUMAR, 2005; CRUNKHORN & MEACOCK, 1971; PASSOS *et al.*, 2007; POSADAS *et al.*, 2004; VINEGAR *et al.*, 1969). A carragenina é um colóide obtido por extração em fase aquosa de variedades naturais de algas das famílias *Gigartinales*, *Solieriales*, *Hypneaales* e *Furcellariales* da classe Rhodophyceae (algas vermelhas). Sua administração na pata promove intensa vasodilatação e extravasamento plasmático pela liberação de mediadores que contribuem também à intensa migração celular

para o sítio inflamatório (CRUNKHORN & MEACOCK, 1971; HENRIQUES *et al.*, 1987).

Em 1969, Levy descreveu que a injeção de carragenina 1% na pata de camundongos causa um edema semelhante, em duração, ao rato, mas menos intenso em proporção. Por volta de 12 anos depois, Sugishita e colaboradores (1981) caracterizaram a fase aguda do edema de pata em camundongos, usando carragenina 3%. Em 1987, Henriques e colaboradores mostraram que a injeção de carragenina induzia um edema bifásico. Posadas e colaboradores (2004) confirmaram que o edema de pata em camundongos é bifásico, ao contrário do edema em ratos, que mostra apenas uma fase aguda. Possui uma resposta inflamatória precoce que dura seis horas, e uma segunda resposta tardia, iniciada em 24 h e que tem seu auge em 72 h, declinando após 96 h. Entretanto, somente camundongos com 7 a 8 semanas, pesando entre 32 e 34 g, mostram uma resposta consistente nestas duas fases.

Este trabalho mostrou que os extratos hidroalcoólicos produzidos a partir das folhas, cascas e sementes da *G. gardneriana*, tanto quando administrados por via oral como por via intraperitoneal, reduziram o edema provocado pela injeção intraplantar de carragenina. Entretanto, quando a via de administração foi a intraperitoneal, os extratos apresentaram efeitos igualmente ou mais eficazes e, no caso dos extratos produzidos a partir das cascas e folhas, um padrão de resposta mais potente e dependente da dose. Esse efeito sugere que a *G. gardneriana* possui componentes com atividade antiedematogênica em um processo inflamatório inespecífico, como a carragenina. Além disso, esses componentes capazes de inibir o edema da carragenina estão presentes em todas as partes testadas da planta, mas principalmente na casca e nas folhas, uma vez que esses foram os extratos mais eficazes.

A formação de edema está entre os sinais iniciais da inflamação. O edema é causado pelo fluxo transvascular de flúido rico em proteínas do compartimento intravascular para dentro do interstício, como resultado da ação da HIS, BK, LT, componentes do complemento, SP e PAF. Estes fatores alteram de forma marcante as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade de capilares e vênulas a água e proteínas (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Estudos anteriores têm mostrado os potenciais antiinflamatórios da *G. gardneriana*. Guimarães e colaboradores (1996b) observaram que o extrato hidroalcoólico da folhas possui efeito inibitório sobre a formação do exsudato e migração leucocitária no modelo de pleurisia, enquanto Luzzi e Guimarães (1995) mostraram que o mesmo extrato impede a formação do edema induzido pela injeção intraplantar de formalina. As membranas pleurais, assim como as células associadas, são componentes metabolicamente ativos e atuam como barreiras para patógenos invasores, ao produzirem respostas imunes inatas e adaptativas. A cavidade pleural é revestida com mesotélio e contém macrófagos residentes, mastócitos e linfócitos. Durante a inflamação pleural, as células mesoteliais são as principais responsáveis pela secreção de quimiocinas como IL-8, proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP-1 α), e proteína quimioatratora do macrófago 1 (MCP-1), que recrutam neutrófilos e células mononucleares. Está bem estabelecido que TNF- α e IL-1 β são citocinas chaves no desenvolvimento da inflamação pleural, atuando no aumento da produção de IL-8 e MCP-1 pelas células endoteliais (FRODE *et al.*, 2001; CAILHIER *et al.*, 2006). O estudo da ação edematogênica da formalina revelou que as mudanças vasculares, no caso de baixas doses de formalina, dependem de uma resposta inflamatória do tipo neurogênica, enquanto maiores doses promovem uma resposta mediada pela liberação de neuropeptídeos, prostanóides e aminas de mastócitos (DAMAS e LIÉGEOIS, 1999). As respostas inflamatórias observadas tanto na pleurisia, quanto no modelo da formalina envolvem fatores fortemente dependentes da ativação celular. A interferência do extrato nestes modelos sugere que substâncias presentes nas folhas podem estar interferindo com o início da resposta inflamatória, mais precisamente a ativação celular, responsável pela liberação de mediadores de alterações na permeabilidade vascular e migração leucocitária. De fato, estudos observaram outros indicadores de atividade antiinflamatória em mais espécies do gênero *Rheedia* e *Garcinia*, como a ação antioxidante e inibidora da peroxidação lipídica da *Rheedia aristata* Griseb (RAMOS *et al.*, 2003). Bem como, a ação do biflavonóide fukugetina (moreloflavona, *Garcinia spicata*) sobre o edema e a atividade da MPO, no edema de orelha induzido pelo TPA e seu efeito inibitório *in vitro* sobre a PLA₂ (GIL *et al.*, 1997). A inibição da liberação celular de mediadores inflamatórios

pode justificar também os efeitos analgésicos observados com o extrato hidroalcoólico das folhas. Observou-se que este extrato é capaz de diminuir, quando administrado pelas vias oral e intraperitoneal, em até 97% o número de contorções abdominais provocadas pela injeção de ácido acético (LUZZI *et al.*, 1994), e em até 98% a resposta dolorosa à segunda fase do teste da formalina (LUZZI e GUIMARÃES, 1995). O ácido acético é conhecido por induzir a liberação rápida de vários mediadores capazes de aumentar a permeabilidade vascular, como BK, SP, HIS, 5-HT, acetilcolina, ATP, íons potássio e hidrogênio, PG e LT (GÖK *et al.*, 1999). A segunda resposta de dor à injeção intraplantar de formalina também apresenta a participação efetiva de mediadores pró-inflamatórios (DAMAS e LIÉGEOIS, 1999). Os efeitos antinociceptivos do extrato foram observados em modelos que envolvem fortes componentes inflamatórios, desta forma, a existência de constituintes do extrato com capacidade de impedir a produção ou liberação de mediadores inflamatórios e com capacidade algogênica pode justificar a analgesia observada.

Os extratos produzidos a partir de diferentes partes da planta foram testados, quanto à melhor via de administração, sobre o modelo do edema de pata induzido pela injeção de carragenina. O uso de diferentes vias, oral e intraperitoneal, não alterou a intensidade do efeito dos EHGG produzidos a partir das cascas ou das sementes sobre o edema. Entretanto, o EHGG produzido a partir das folhas mostrou-se mais eficaz ao ser administrado pela via intraperitoneal, situação em que promoveu $72 \pm 4\%$ de inibição edematogênica, contra $39 \pm 5\%$ de Imáx obtida com a administração oral desse extrato. Estudos feitos com a *Rheedia longifolia* revelaram o mesmo comportamento do extrato sobre as vias de administração, sendo possível observar que, o extrato desta planta apresenta efeitos inibitórios no modelo de contorções por ácido acético, contudo, este efeito é mais potente quando o extrato é injetado na cavidade peritoneal do animal (FRUTUOSO *et al.*, 2007). O fato de um extrato apresentar melhor efeito quando administrado pela via intraperitoneal do que pela via oral pode ser atribuído à absorção diminuída no trato gastrointestinal, em comparação com a cavidade peritoneal, e/ou um efeito do metabolismo de primeira passagem, caso em que um ou mais

componentes ativos são metabolicamente inativados após sua passagem pelo fígado.

Observou-se também a duração da ação antiedematogênica do EHGG das folhas sobre a 4ª hora do edema. O efeito inibitório foi observado desde o tratamento quatro horas antes, até duas horas depois da carragenina (ou seja, duas horas antes da avaliação do edema). Isto indica que os compostos presentes no EHGG responsáveis por esse efeito possuem ação prolongada, que pode durar até oito horas após sua administração, e já possuem ação contra uma resposta inflamatória presente, sendo duas horas o tempo mínimo para serem eficazes. O tempo necessário à manifestação do efeito, bem como a duração deste, sugere que um ou mais compostos presentes no extrato podem estar atuando em vários níveis da transdução dos sinais dos mediadores inflamatórios e/ou contra diferentes mediadores, sendo que a combinação de ação pode resultar em reversão do processo inflamatório. Um novo medicamento antiinflamatório com vários alvos de ação pode apresentar maior eficácia e potência, com menos efeitos colaterais. Inclusive, esta é uma nova abordagem discutida mundialmente como opção para redução dos efeitos indesejáveis, e muitas moléculas estão sendo desenvolvidas com esse objetivo.

A inflamação aguda é caracterizada por vasodilatação, exudação de fluido rico em proteínas (plasma) e migração celular (primariamente neutrófilos) para o local da lesão (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Assim, seguindo o aumento na permeabilidade vascular, há o infiltrado celular, principalmente de neutrófilos (na fase aguda), que contribuem para a resposta inflamatória através da produção, dentre outros mediadores, de radicais livres derivados do oxigênio, como o ânion superóxido e radicais hidroxilas (POSADAS *et al.*, 2004). Possivelmente, a persistência da resposta inflamatória provocada pela carragenina após o período de 3 a 4 h seja devido à migração de leucócitos para o tecido, liberação de enzimas proteolíticas por estas células e geração de PG no local. Tais fatores mantêm a permeabilidade vascular aumentada, e podem causar dano ao tecido conjuntivo, com a liberação ou formação de mediadores adicionais (CRUNKHORN e MEACOCK, 1971). Assim, outro fator importante para avaliação da resposta inflamatória é a migração de células inflamatórias, neutrófilos, para o local da lesão. Um

parâmetro comumente usado para se ter uma medida, mesmo que indireta, do conteúdo tecidual de neutrófilos é a medida da presença de MPO ativa. A MPO é uma enzima, encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, liberada após a ativação deste leucócito, dentro do fagossomo ou no espaço extracelular. Uma vez liberada, a MPO reage com o peróxido de hidrogênio formado pela NADPH oxidase, e aumenta o potencial tóxico deste oxidante. O sistema hidroperóxido-MPO, também promove a oxidação do cloreto, tirosina e nitrito, induzindo a formação de ácido hipocloroso, outros derivados do cloro, radicais tirosina, e intermediários reativos de nitrogênio; enfim, compostos que podem atacar a superfície das membranas dos microorganismos (FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003). Sendo assim, a inibição da MPO é mais um indicador convincente de atividade antiinflamatória (BRADLEY *et al.*, 1982; FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003; PASSOS *et al.*, 2007).

O aumento na atividade da enzima MPO em patas estimuladas consiste em importante característica do modelo da inflamação pela carragenina (PASSOS *et al.*, 2007). Achados histológicos revelam, entre três a quatro horas após o desafio com a carragenina, infiltrado celular difuso com predomínio de leucócitos PMN (neutrófilos) (HENRIQUES *et al.*, 1987; VINEGAR *et al.*, 1987). Posadas e colaboradores (2004) analisaram a infiltração celular neste modelo de edema de pata e observaram que os níveis de MPO indicam picos de migração celular em 6 e em 24 h, mostrando que, mesmo que o edema tenha diminuído, há uma infiltração leucocitária consistente, a qual é mantida até a 24^a hora do edema. Quando avaliada a atividade da MPO, o tratamento prévio dos animais com EHGG (folhas, cascas e sementes) foi capaz de impedir o aumento na atividade da enzima MPO nas patas estimuladas. Desta forma, estes achados podem ser interpretados como uma potencial atividade antiinflamatória da *G. gardneriana* sendo esta capaz de reduzir a atividade de neutrófilos. Isso é de grande interesse, principalmente no tratamento de processos inflamatórios crônicos, onde a atividade de células inflamatórias é um dos fatores responsáveis pela manutenção da doença. Drogas que possuem esse tipo de ação bastante conhecida são os antiinflamatórios esteroidais, como a dexametasona (utilizada como controle positivo nesse teste). Assim, como esperado, a dexametasona reduziu em mais de 50% a

atividade enzimática nas três medidas executadas. Dentre os muitos mecanismos de ação, a dexametasona reduz a ativação de fatores de transcrição como a Proteína Ativadora – 1 (AP-1) e o fator nuclear NF- κ B, fatores relacionados com a ativação de genes de citocinas primárias como TNF α e IL-1 β , gatilhos potentes de muitas ações envolvidas na migração leucocitária. A redução do influxo neutrofílico também está associada à inibição da mieloperoxidase (PEREIRA *et al.*, 2006), corroborando com os efeitos inibitórios da dexametasona sobre os neutrófilos.

Tanto o EHGG produzido a partir das folhas, quanto o EHGG produzido das cascas reduziram em mais de 40% a atividade enzimática. Entretanto, o extrato obtido das folhas apresentou maior potência, pois sua menor dose (30 mg/kg) foi capaz de promover a maior redução, enquanto o EHGG das cascas só alterou a atividade enzimática no grupo de animais tratados com 300 mg/kg de EHGG. Este achado pode indicar que os compostos envolvidos na inibição da migração celular estão presentes em maiores concentrações nas folhas, sendo necessárias menores doses para a observação deste efeito. Tal hipótese, somada aos seguintes fatos: o EHGG das folhas pode ser obtido com maior facilidade, visto que a árvore possui folhas o ano todo; sua obtenção não apresenta risco à sobrevivência da planta; e estudos fitoquímicos de sua constituição permitiram o isolamento de compostos para estudos mais aprofundados; levou à escolha deste extrato para dar continuidade aos estudos.

O protocolo utilizado para medida da MPO avalia a presença de enzima ativa no tecido, desta forma, um tratamento que apresente diminuição deste parâmetro pode ter agido de duas formas: através da inibição da migração dos neutrófilos para o sítio inflamatório; ou por impedir a atividade da enzima. Uma vez observado que todos os extratos testados promoveram, em maior ou menor intensidade, redução na atividade da MPO, a etapa seguinte consistiu em verificar se o extrato poderia estar interferindo diretamente na atividade da enzima, em vez de agir sobre a migração de neutrófilos. Para tanto, fez-se a incubação do EHGG da folhas com homogenatos de patas tratadas com carragenina, com intenso infiltrado de células no local, e conseqüentemente uma intensa atividade da MPO. Neste caso, a diminuição da MPO seria devido ao bloqueio de sua atividade, uma vez que as células já migraram para o

tecido, excluindo a dúvida sobre a infiltração leucocitária. O resultado demonstra que o EHGG das folhas não inibiu, de forma direta, a atividade enzimática, quando incubado com a enzima. Esse dado sugere que a diminuição da atividade da MPO após tratamento com o EHGG das folhas *in vivo* não se deve à inibição da atividade da MPO, podendo indicar que o efeito do extrato é sobre a migração de neutrófilos.

Vários estudos relatam que cortes histológicos de patas com edema induzido pela carragenina, revelam no pico entre a 3^a e a 4^a hora, edema acompanhado de intenso infiltrado inflamatório (ARYA e KUMAR, 2005, HENRIQUES *et al.*, 1987). Neste estudo, a análise histológica da região subplantar das patas após 4 h de edema, confirmou a ação inibitória da dexametasona sobre a migração leucocitária, revelando cortes com aparência muito semelhante às amostras basais. Além desta observação, os cortes histológicos evidenciaram que o tratamento com o EHGG das folhas diminuiu, de forma marcante, o infiltrado celular. Dado que confirma claramente os resultados obtidos com as medidas da atividade da MPO, com incubação do extrato antes do estímulo (*in vivo*) e após o estímulo (*in vitro*). Informações que contribuem para a hipótese da ação antiinflamatória do extrato.

Flavonóides são compostos fenólicos antioxidantes de vasta distribuição entre as plantas que têm demonstrado importantes atividades antiinflamatórias tanto *in vitro* como *in vivo* (CALIXTO *et al.*, 2003). São conhecidos por exercerem um potente efeito inibitório sobre inúmeras enzimas relacionadas à ativação celular e à produção de mediadores inflamatórios (BRITO *et al.*, 2007). Conforme dados da literatura, os biflavonóides isolados das folhas: volkensiflavona, fukugesida, GB-2a, fukugetina, e GB-2a-II-4'-Ome; demonstraram ação analgésica em relação à segunda fase do teste da formalina (dor inflamatória) (CECHINEL FILHO *et al.*, 2000; LUZZI *et al.*, 1997; DA SILVA e GUIMARÃES, 1997). O fukugetina também apresentou ação antiedematogênica sobre o mesmo modelo e bloqueou a resposta anafilática induzida pela administração endovenosa de ovoalbumina (DA SILVA e GUIMARÃES, 1997). O próximo passo do presente estudo foi avaliar o efeito do fukugetina e do GB-2a, compostos isolados do EHGG das folhas, sobre o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. Observou-se que ambos possuem ação antiedematogênica, sendo que o GB-2a apresentou

efeito mais potente e dependente da dose. Diversos compostos já foram isolados das folhas da *G. gardneriana*, sendo predominante a referência aos compostos fenólicos como a benzofenona prenilada 7-epiclusianona (SANTOS *et al.*, 1998) e os biflavonóides citados, o que oferece campo para inúmeras possibilidades terapêuticas.

As benzofenonas polipreniladas possuem um amplo espectro de atividades descritas, como antioxidantes, seqüestradoras de radicais livres, agentes antiulcerogênicos, inibidoras da expressão de iNOS e COX-2 em carcinoma e apoptóticos. Um importante exemplo deste grupo é o garcinol, figura 25 (KRISHNAMURTHY *et al.*, 1981), um derivado poliisoprenilado encontrado em grandes quantidades na família Guttiferae e em várias espécies do gênero *Garcinia*. O garcinol possui importantes propriedades descritas, como forte antioxidante (SANG *et al.*, 2002; SELVI *et al.*, 2003), apoptótico (SANG *et al.*, 2002; BALASUBRAMANYAM *et al.*, 2004; VARIER *et al.*, 2004) e inibidor de crescimento em cultura de células leucêmicas (MATSUMOTO *et al.*, 2003) e de câncer intestinal (HONG *et al.*, 2007). Também impede a expressão de iNOS e COX-2 em astrócitos estimulados com LPS (LIAO *et al.*, 2005), inibe a proliferação celular e a expressão de COX-2 em um modelo de câncer de língua (YOSHIDA *et al.*, 2005) e, em macrófagos estimulados com LPS, inibe a liberação de AA e expressão de iNOS, por impedir a fosforilação da PLA₂ e da proteína quinase ativada por mitógenos ERK 1/2, respectivamente (HONG *et al.*, 2006).

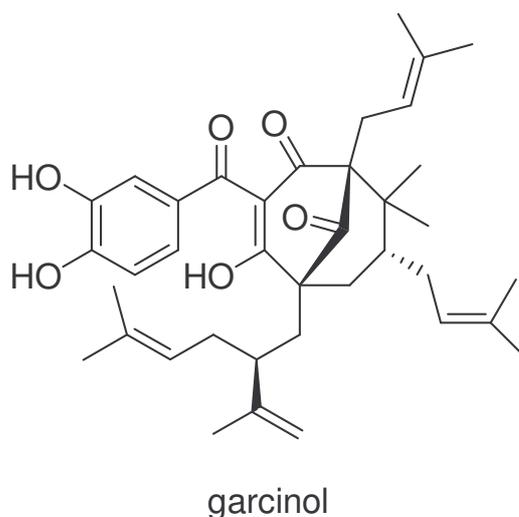


Figura 25: Estrutura química do garcinol.

A 7-epiclusianona, por sua vez, é muito semelhante ao garcinol e possui ações vasculares ambíguas, promovendo, em baixas concentrações, vasodilatação dependente de NO e, em altas concentrações, vasoconstrição derivada de produtos do AA (CRUZ *et al.*, 2006). Esta benzofenona demonstrou ações antianafiláticas sobre contrações de íleo de cobaia induzidas por antígeno e sobre a liberação de histamina nestes estados (NEVES *et al.*, 2007). Gil e colaboradores (1997) descreveram importantes observações sobre o fukugetina, como a atividade bloqueadora *in vitro* sobre a PLA₂ secretória, antiedematogênica sobre o edema de pata da carragenina, e sobre o edema de orelha por TPA, onde também reduziu a MPO, sem interferir com a síntese de eicosanóides. O fukugetina também é capaz de inibir a peroxidação lipídica *in vitro*, e apresentar ação como seqüestrador de ânions superóxido (SANZ *et al.*, 1994). Espécies reativas, tanto de oxigênio como de nitrogênio, além de possuírem importante ação microbicida, podem lesionar moléculas protéicas, mitocôndrias e DNA, levando à necrose celular. Somado ao seu ataque direto, esses radicais também modulam atividades celulares e mediadores, levando à amplificação do sinal inflamatório (DYKE e SERHAN, 2003; PACHER *et al.*, 2007). Somando estas considerações às observações anteriores, o efeito antiinflamatório do EHGG das folhas pode ser atribuído à ação sinérgica dos vários compostos presentes no extrato, como a atividade vasoconstritora da 7-epiclusianona, as capacidades antioxidante e de inibição da MPO que o fukugetina possui, e a ação dos demais biflavonóides como o GB-2a que, de acordo com os dados da literatura, possuem potencial antiinflamatório.

Inúmeros mediadores estão envolvidos na resposta inflamatória produzida por agentes flogísticos. A fase inicial da inflamação aguda envolve a migração de células associada à liberação de mediadores como histamina, serotonina e SP, que é seguida pela produção de BK e PG. Todos estes mediadores levam a uma reação inflamatória quando injetados na camada subcutânea da pata de ratos e camundongos (GILLIGAN *et al.*, 1994; ARYA e KUMAR, 2005).

Na resposta inflamatória aguda induzida pela carragenina, os níveis de SP nas patas inflamadas aumentam em cerca de 15 min após a indução do edema, atingem sua produção máxima em 30 min, e permanecem elevados

durante as primeiras 2 h de inflamação (GILLIGAN *et al.*, 1994). SP, um neuropeptídeo endógeno que pertence à família das taquicininas e age através do receptor de neurocininas do tipo 1 (NK1), é um potente mediador do aumento da permeabilidade vascular através de sua ação sobre as células endoteliais pós-capilares, em espécies que incluem os camundongos, e possui potente ação sobre os componentes celulares da inflamação, tais como o acúmulo de neutrófilos (KEEBLE *et al.*, 2005). Injeções intradérmicas de taquicininas na pata ou pele de ratos levam à produção de edema e extravasamento plasmático, através de mecanismos diretos e indiretos, pela liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), de HIS e serotonina a partir de mastócitos, assim como pela liberação de prostanoídes e NO (ALVES *et al.*, 1999). Considerando-se que as taquicininas endógenas possuem preferência, mas não seletividade definitiva para cada um dos subtipos de receptores, a participação dos receptores NK1, 2 e 3 na formação do edema permanece sob discussão. Assim, o edema de pata e o extravasamento vascular causado pelas taquicininas, semelhantemente ao edema de orelha em camundongos, são atribuídos à ativação dos múltiplos subtipos de receptores de taquicininas, entretanto, sua interação com receptores NK1 parece ter maior importância (ALVES *et al.*, 1999). O EHGG inibiu a formação do edema induzido pela SP, o que sugere que este extrato pode estar produzindo seus efeitos antiinflamatórios durante a fase inicial do edema da carragenina, através da inibição da atividade dos neuropeptídeos. Resultados de Da Silva e Guimarães (1997) mostram que o EHGG não só inibe a segunda fase da formalina, como também o edema induzido por este agente. A administração intraplantar de formalina induz a formação de edema que depende principalmente da liberação de SP, podendo haver a participação de prostanoídes e aminas vasoativas (DAMAS e LIÉGEOIS, 1999). Desta forma, os atuais resultados com o EHGG, como a inibição do edema da SP, vêm confirmar informações anteriormente obtidas, evidenciando a capacidade antiinflamatória do extrato.

Outros mediadores inflamatórios, como a histamina e BK, foram identificados e também demonstraram importante participação no começo do edema induzido pela carragenina (VINEGAR *et al.*, 1969; DI ROSA *et al.*, 1971). Desta forma, o EHGG também pode estar exercendo alguns dos seus

efeitos ao interferir com a atividade de um destes mediadores, de fato, este extrato inibiu o edema de pata induzido tanto pela injeção de histamina, como de BK.

A BK é um peptídeo vasoativo, principal representante do sistema das cininas (KUMAR *et al.*, 2005). A BK é capaz de induzir influxo celular e extravasamento plasmático. Uma vez liberadas, as cininas ativam seus receptores B₂ e/ou B₁, o que resulta na liberação de outros mediadores, como PG, LT, histamina, NO, PAF e citocinas; derivados principalmente de leucócitos polimorfonucleares, mastócitos, macrófagos e células endoteliais (ARYA e KUMAR, 2005; SALEH *et al.*, 1997). Trabalhos anteriores com o EHGG demonstraram a inibição do exsudato pleural induzido pela BK (DA SILVA e GUIMARÃES, 1997). A capacidade de inibir o edema de pata produzido pela BK, apresentada pelo EHGG da folhas nesse estudo, é uma importante confirmação desse resultado prévio. São várias as possibilidades de mecanismos através dos quais o extrato pode estar promovendo estes efeitos: 1- através da atuação de seus compostos sobre a ligação da BK aos seus receptores; 2- pela redução no influxo de neutrófilos, demonstrada na redução da MPO e nos cortes histológicos; 3- através de outros mecanismos que interfiram com a ação das PG, da histamina e/ou das citocinas, mediadores cujas respostas dependem as cininas.

Conforme descrito, logo após a injeção de carragenina, há um repentino aumento do volume da pata, relacionado com a ação das aminas vasoativas sobre a permeabilidade vascular (VINEGAR *et al.*, 1969). Histamina, uma amina vasoativa, está entre os primeiros mediadores pré-formados a serem liberados durante a inflamação (KUMAR *et al.*, 2005). É responsável, através da ação sobre seus receptores específicos H1 e H2, juntamente com outros mediadores, pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (ALLER *et al.*, 2006; GUZIK *et al.*, 2003; NATHAN, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A principal fonte de histamina do organismo são os mastócitos teciduais (COUSSENS e WERB, 2002; DRAY, 1995; GUZIK *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005; NATHAN, 2002) e este mediador pode levar à ativação de outras células como as células endoteliais, levando à expressão de moléculas de adesão (WALZOG e GAEHTGENS, 2000). O EHGG impediu a formação do edema de pata pela histamina. Tal fato pode ser devido à ação dos compostos

do extrato sobre os receptores deste mediador, presente nos diversos tipos celulares do local da lesão ou mesmo sobre seu mecanismo de transdução.

Mastócitos também são importantes na fase aguda da inflamação, pertencendo a este tipo celular, a liberação dos mediadores inflamatórios armazenados e dos recém sintetizados, como aminas vasoativas, PAF, LT, e uma variedade de citocinas que podem produzir muitos eventos associados à inflamação, como a formação de edema e a infiltração celular (COUSSENS e WERB, 2002; ARYA e KUMAR, 2005; BRITO *et al.*, 2007). O composto 48/80 é conhecido por estimular diretamente proteínas G por mecanismos não-imunológicos, causando a degranulação maciça de mastócitos (DATTI *et al.*, 2002). Histamina, serotonina e PAF têm sido implicados como os principais mediadores envolvidos na formação do edema alérgico induzido pelo composto 48/80 (BRITO *et al.*, 2007). O EHGG reduziu o edema induzido pela histamina, e pelo 48/80. Entretanto, apesar de ter inibido de modo significativo o edema da histamina, o EHGG causou um pequeno efeito sobre o edema de pata do composto 48/80. Esse fato pode ser explicado pelos demais mediadores envolvidos na formação deste edema (48/80) como serotonina e PAF, onde talvez o extrato não tenha atuação.

Os ésteres de forbol, diterpenos de origem vegetal, são clássicos ativadores exógenos da proteína quinase do tipo C (PKC) (CASTAGNA *et al.*, 1982). A PKC fosforila muitos componentes celulares, incluindo enzimas, canais iônicos e receptores ligados à membrana; sua ativação pelos ésteres de forbol resulta na excitação e aumento da liberação de neuropeptídeos (SP e CGRP), de culturas de neurônios sensoriais e de amostras de pele, de forma análoga à BK (RICHARDSON e VASKO, 2002; FERREIRA *et al.*, 2005). Ainda, SP e CGRP (atuando em NK₁ e CGRP₁, respectivamente) causam extravasamento plasmático e edema, o que permite ao tecido injetado o contato com mediadores plasmáticos, incluindo os cininogênios. De fato, a injeção do éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) produz nocicepção acompanhada de extravasamento plasmático e formação de edema (FERREIRA *et al.*, 2005). Conforme relatado, a BK estimula a liberação de transmissores a partir dos nervos sensoriais através da ativação da via de transdução da PKC (RICHARDSON e VASKO, 2002; FERREIRA *et al.*, 2005). Uma vez que a via da PKC sofre regulação de inúmeros mediadores pró-

inflamatórios e algógenos, como BK, ATP e PG, sua estimulação pode contribuir não apenas para estados de dor crônica, mas também para a dor inflamatória aguda e conseqüentemente, à formação de edema.

Em modelos de aumento de permeabilidade vascular induzido pelo TPA, em pele de camundongos, observou-se que este aumento pode ser mediado, ainda e principalmente, pela histamina e serotonina e, em maiores doses de TPA também há a participação do PAF. Observou-se também que o TPA induz degranulação de mastócitos e liberação de histamina quando injetado na cavidade pleural de ratos, e causa liberação de PAF de células mononucleares residentes, o que confirma a participação destes mediadores no mecanismo de ação do TPA (QU *et al.*, 1990). Outro fato bem estabelecido é o de que a inflamação induzida pelo TPA está relacionada com a ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂), que libera AA das membranas celulares que, por sua vez, é metabolizado a PG e LT. Substâncias capazes de inibir este tipo de edema podem ser inibidores da COX e/ou LOX (RECIO *et al.*, 2000).

Conforme citado, além dos produtos da PLA₂, muitos outros agentes estão envolvidos na geração de edema, como serotonina e BK, os quais atuam diretamente através de seus receptores específicos (5HT₂ e B₂, respectivamente) presentes no endotélio. Há ainda a participação dos demais mediadores produzidos e/ou liberados pela via da PKC, pois o pré-tratamento com antagonistas da PKC pode suprimir a inflamação. Desta forma, o número de agentes e mecanismos de ação que podem reduzir o edema promovido pelo TPA, é grande (RECIO *et al.*, 2000).

A pré-exposição a inibidores de PKC, ou a redução da sua quantidade, promove uma atenuação da liberação de transmissores, estimulada pela BK, a partir dos nervos sensoriais. Inibidores de PKC são capazes de bloquear a nocicepção produzida pela BK, epinefrina ou carragenina, tanto em ratos como em camundongos (RICHARDSON e VASKO, 2002; FERREIRA *et al.*, 2005). Foi demonstrado que o NO e o TNF- α requerem a atividade da PKC para sua expressão (KOVACS *et al.*, 1988; SEVERN *et al.*, 1992). A inibição da ação destes mediadores nos modelos da carragenina ou da artrite induzida pelo adjuvante de Freund tem sido associada a uma redução dramática na resposta inflamatória (MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 1993; IANARO *et al.*, 1994; SEKUT *et al.*, 1995; CONNOR *et al.*, 1995). Muitos outros mediadores pró-

inflamatórios ou vias envolvidas em sua produção, como IL-1 β e COX-2 (SHAPIRA *et al.*, 1994; BLANCO *et al.*, 1995), têm sua expressão dependente da atividade da PKC (FILLION e PHILLIPS, 1997). Nessa mesma cascata, muitos componentes são os mesmos envolvidos na resposta desencadeada pela carragenina e, portanto, compostos podem apresentar ação por interagirem nos mesmos elementos que compõe os dois tipos de resposta inflamatória (carragenina e TPA). Como o EHGG reduziu os edemas provocados tanto pela administração intraplantar, quanto tópica de TPA, além de diminuir o edema de pata induzido pela BK e carragenina, o envolvimento dos componentes do extrato na via da PKC pode ser uma das explicações para estas atividades antiinflamatórias observadas.

Outro mediador inflamatório importante testado foi a PGE₂, onde o extrato foi novamente ativo. Após a rápida liberação de inúmeros mediadores responsáveis pelo início da resposta edematogênica promovida pela carragenina, esta é subsequente mantida pela produção de PG e NO, produzidos pelas isoformas de ciclooxigenase (COX-1 e 2), e pela iNOS, respectivamente (DI ROSA *et al.*, 1971; SEIBERT *et al.*, 1994; SALVEMINI *et al.*, 1996; TRATSK *et al.*, 1997; NANTEL *et al.*, 1999; POSADAS *et al.*, 2004). As PG possuem efeitos distintos sobre a inflamação. A PGE₂ e a PGI₂ são vasodilatadoras, especialmente nas arteríolas, meta-arteríolas pré-capilares e vênulas. Elas causam aumento da permeabilidade vascular em sinergia com outros mediadores, como histamina e BK (SAYAR e MELLI, 1999; ÖZDÖL e MELLI, 2004). A PGE₂, o produto mais importante da COX, exibe uma ampla variedade de ações biológicas em diversos tecidos através da sua ligação a receptores específicos na membrana plasmática. Esta PG, geralmente é considerada um mediador pró-inflamatório chave; altos níveis de PGE₂ foram encontrados em exudatos inflamatórios, e a injeção de PGE₂ diretamente em um tecido mostrou induzir sinais clássicos de inflamação (CLAUDINO *et al.*, 2006). A PGE₂ é um dos principais mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pela carragenina (PASSOS *et al.*, 2007) e, até a 6^a hora, é produzida pela COX-1, pois a COX-2 está indetectável. Nessa fase, essa prostaglandina apresenta um pico na 2^a hora após a injeção da carragenina (POSADAS *et al.*, 2004). Yuhki e colaboradores (2004) mostraram a participação dos subtipos de receptores para prostaglandinas IP, EP₂, EP₃,

mas não EP₁ ou EP₄, na formação de exudato no modelo de pleurisia induzida pela carragenina. Observou-se que o antagonista do receptor EP₃, L826266, inibe de forma consistente o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos, na mesma extensão em que é capaz de reduzir a formação de edema mediado pela injeção intraplantar de PGE₂ (CLAUDINO *et al.*, 2006).

Os dados apresentados por Claudino e colaboradores (2006) mostram que a injeção de PGE₂ produz um edema mediado, principalmente, pela ativação de receptores EP₃, sem descartar a participação do subtipo EP₁; e a formação do edema se dá de forma dependente da ativação dos receptores do tipo TRPV1, e pela ação da SP em seus receptores NK1, assim como envolve a ativação coordenada da PKC e das MAP kinases JNK e p38. Portanto, como o EHGG das folhas inibiu a resposta inflamatória da PGE₂ na pata e também dos edemas induzidos pela SP e pelo TPA, é provável que a inibição da ação da SP e/ou de algum passo na via da PKC, estejam envolvidos na redução da ação da PGE₂ pelo extrato, assim como pode haver o bloqueio de um ou mais receptores desta prostaglandina.

O ácido araquidônico é clivado dos fosfolípidos de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) e da fosfolipase C (PLC) (KUMAR *et al.*, 2005; RICHARDSON e VASKO, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001). Duas classes principais de enzimas são responsáveis pela síntese de seus metabólitos, também chamados de eicosanóides: as ciclooxigenases sintetizam as PG e os TX; e as lipoxigenases produzem os LT e as LXs (ALWANI *et al.*, 2006; DRAY, 1995; KUMAR *et al.*, 2005; WAGNER e ROTH, 2000). Considerando-se que a PGE₂ é o principal produto da COX, ainda resta a ação edematogênica dos produtos da LOX. Os LT, assim como as PG, têm ação vasodilatadora e edematogênica (ALLER *et al.*, 2006; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Os LT, em especial o LTB₄, também ativam as respostas dos neutrófilos, como agregação e adesão ao endotélio venular, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisossomais (KUMAR *et al.*, 2005; NATHAN, 2002), além da potente atividade quimiotática (KUMAR *et al.*, 2005; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Curiosamente, o edema produzido pelo AA não foi inibido pelo EHGG. Este resultado pode ser explicado pela provável participação dos produtos da LOX e/ou da PGI₂, visto que a PGE₂ tem seu efeito inibido pela ação do EHGG.

Portanto, podemos destacar que os dados mais relevantes obtidos foram: (1) os EHGG produzidos a partir das folhas, cascas, e sementes, administrados pela via oral e intraperitoneal, reduziram o edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina; (2) a redução do edema foi mais potente e dependente da dose para os extratos das folhas e das cascas, e quando estes foram administrados por via intraperitoneal; (3) os biflavonóides fukugetina e GB-2a, administrados pela via i.p., reduziram o edema de pata da carragenina, sendo que o GB-2a apresentou efeito dependente da dose; (4) o EHGG das folhas reduziu a atividade da enzima MPO nas três doses administradas pela via i.p.; (5) o EHGG das folhas apresentou ação antiedematogênica sobre a quarta hora, quando administrado até quatro horas antes e duas horas depois da injeção de carragenina, pela via i.p.; (6) o EHGG das folhas promoveu importante redução do infiltrado leucocitário para o local do edema, avaliado histologicamente quatro horas após a injeção de carragenina; (7) o EHGG das folhas, administrado pela via i.p., reduziu os edemas provocados pelas injeções intraplantares de BK, HIS, PGE₂ e SP; por fim, (8) o EHGG das folhas, via i.p., diminuiu os edemas de orelha e de pata provocados pela administração de TPA.

O fato de que o extrato testado atenuou de forma consistente o edema induzido pela carragenina, assim como por mediadores conhecidos por participar da resposta à carragenina, como a BK, SP, HIS, e PGE₂, permite sugerir que a ação antiinflamatória do EHGG produzido a partir das folhas, está relacionada à inibição de uma ou mais vias de sinalização intracelular envolvidas nos efeitos desses mediadores, como na ativação da PKC, ou PLA₂, figura 26. Entretanto, o EHGG parece não comprometer completamente a degranulação de mastócitos, nem a formação de metabólitos do AA. Estas hipóteses podem ser sustentadas pelas inúmeras ações, observadas para os diferentes compostos, presentes na constituição do EHGG das folhas, como a 7-epiclusianona que, dependendo da concentração em que está presente, possui ação vasoconstritora em artéria isolada (CRUZ *et al.*, 2006) e antianafilática em íleo isolado (NEVES *et al.*, 2007); o fukugetina (moreloflavona), com ação antiedematogênica em vários modelos (DA SILVA e GUIMARÃES, 1997; GIL *et al.*, 1997), atividade inibitória sobre a PLA₂ *in vitro*,

sobre a MPO (GIL *et al.*, 1997) e antioxidante (SANZ *et al.*, 1994; GIL *et al.*, 1997).

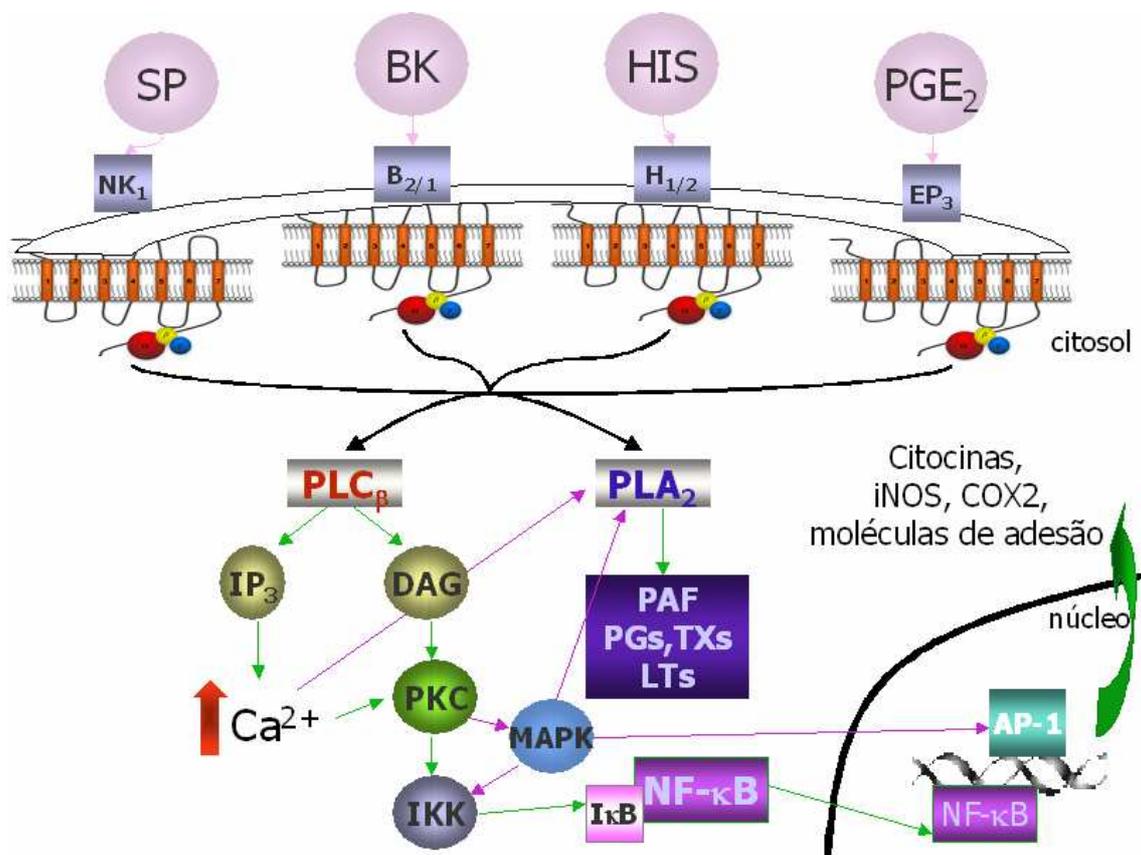


Figura 26: Vias de transdução envolvidas na ação dos mediadores BK, SP, HIS e PGE₂. Estes mediadores exercem suas ações através de seus receptores específicos, acoplados à proteína G, que levam à degradação de fosfolípidos de membrana em trifosfato de inositol (IP₃), diacilglicerol (DAG) e AA que, por sua vez, aumentam os níveis de cálcio intracelulares, ativam proteínas quinases e formam eicosanóides, respectivamente. A ação da PKC leva à ativação de fatores de transcrição que promovem a síntese de inúmeras moléculas pró-inflamatórias. Os diversos compostos presentes no extrato podem exercer suas ações interferindo com diferentes passos dessas vias.

Enfim, os vários compostos fenólicos já isolados das folhas da *G. gardneriana*, bem como os constituintes desta que permanecem desconhecidos à espera de isolamento e identificação, podem ter seus efeitos distintos somados. Esta ação em conjunto pode estar reduzindo a resposta inflamatória nos seus diferentes eventos (alterações vasculares, migração celular, produção de mediadores e espécies reativas tóxicas que dão continuidade à resposta), garantindo a característica antiinflamatória atribuída ao EHGG. Contudo, para a melhor elucidação das vias envolvidas nas ações

do EHGG produzido a partir das folhas, são necessários experimentos mais detalhados e aprofundados, como a influência sobre a expressão e atividade de enzimas, citocinas e fatores de transcrição, como a COX, NOS, IL-1 β , TNF- α e NF- κ B.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Esse trabalho incrementa resultados anteriores sobre a atividade antiinflamatória da *G. gardneriana*. Foi mostrado que o tratamento com o EHGG possui ação antiinflamatória em vários modelos experimentais, o que é evidenciado pela diminuição do edema de pata induzido pela carragenina, assim como por alguns mediadores conhecidos por participar da resposta à carragenina, como BK, histamina, SP e PGE₂. Além da redução na migração de neutrófilos e da nítida melhora do quadro inflamatório observado na análise histológica. Os biflavonóides isolados das folhas, que já haviam apresentado atividades analgésicas e antiinflamatórias, também reduziram o edema induzido pela carragenina, indicando sua participação no efeito do EHGG.

As folhas da *G. gardneriana* são usadas popularmente no tratamento de estados inflamatórios, dores e infecções. As evidências obtidas neste trabalho dão suporte à efetividade do uso popular do EHGG no tratamento da inflamação, como uma reação exacerbada e lesiva do organismo, através da regulação, em diversos níveis, dos mediadores envolvidos na resposta.

Tais resultados também indicam possibilidades reais para esta planta como fonte abundante de compostos ativos, cuja pesquisa aprofundada pode levar à descoberta de uma nova e melhor alternativa terapêutica aos estados patológicos com quadro inflamatório agudo, e futuramente até para doenças inflamatórias crônicas debilitantes, situações em que a inflamação consiste em doloroso agravante do bem estar dos indivíduos. Para tanto, devem ser realizados experimentos adicionais para o melhor esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiinflamatória e analgésica, bem como estudos de toxicidade e segurança para o uso repetido do extrato e de seus componentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v. 43 (6), p. 1255 – 1260, 1996.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 202 – 209, 2007.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12 (10), p. 225 – 234, 2006.

ALVES, T. M.; ALVES, R.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; DOS SANTOS, M. H.; NAGEM, T. J. Biological Activities of 7-Epiclusianone. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 369 – 371, 1999.

ALWANI, M. E.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 171–183, 2006.

ARUMUGAN, T. V.; MAGNUS, T.; WOODRUFF, T. M.; PROCTOR, L. M.; SHIELS, I. A.; TAYLOR, S. M. Complement mediators in ischemia–reperfusion injury. **Clinica Chimica Acta**, v. 374, p. 33–45, 2006.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of látex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 228 – 232, 2005.

BALASUBRAMANYAM, K.; ALTAF, M.; VARIER, R. A.; SWAMINATHAN, V.; RAVINDRAN, A.; SADHALE, P. P.; KUNDU, T. K. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses

chromatin transcription and alters global gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279 (32), p. 33716 – 33726, 2004.

BARAK, V.; BIRKENFELD, S.; HALPERIN, T.; KALICKMAN, I. The effect of herbal remedies on the production of human inflammatory and anti-inflammatory cytokines. **The Israel Medical Association Journal**, v. 4 (11), p. 944 – 946, 2002.

BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: A reappraisal. **Pharmacological Research**, v. 44 (6), p. 437 – 450, 2001.

BITTAR, M.; DE SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; LENTO, R.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive activity of I3,I18-binarigenin, a biflavonoid present in plants of the guttiferæ. **Planta Médica**, v. 66, p. 84 – 86, 2000.

BLANCO, A.; HABIB, A.; LEVY-TOLEDANO, S.; MACLOUF, J. Involvement of tyrosine kinase in the induction of cyclo-oxygenase-2 in human endothelial cells. **The Biochemical Journal**, v. 312, p. 419 – 423, 1995.

BONDER, C. S.; KUBES, P. The Future of GI and Liver Research: Editorial Perspectives II. Modulating leukocyte recruitment to splanchnic organs to reduce inflammation. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 284, p. 729 – 733, 2003.

BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 29 – 38, 1996.

BOTTA, B.; MAC-QUHAE, M. M.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; DE MELLO, J. F. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. V: Biflavonoids and xanthochymol. **Journal of Natural Products**, v. 47 (6), p. 1053, 1984.

BRAZ FILHO, R.; CAVALCANTE DE MAGALHÃES, G.; GOTTLIEB, O. R. Xanthones of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 9, p. 673, 1970.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206 – 209, 1982.

BRITO, F. A.; LIMA, L. A.; RAMOS, M. F. S.; NAKAMURA, M. J.; CAVALHER-MACHADO, S. C.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; SAMPAIO, A. L. F. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 105 – 115, 2007.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107 (2), p. 139 – 154, 2005.

CAILHIER, J. F.; SAWATZKY, D. A.; KIPARI, T.; HOULBERG, K.; WALBAUM, D.; WATSON, S.; LANG, R. A.; CLAY, S.; KLUTH, D.; SAVILL, J.; HUGHES, J. Resident Pleural Macrophages Are Key Orchestrators of Neutrophil Recruitment in Pleural Inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, p. 540 – 547, 2006.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131 – 134, 2005.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kB (NF-kB). **Planta Médica**, v. 69 (11), p. 973 – 983, 2003.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, v. 70, p. 93 – 103, 2004.

CARVALHO, E. S. Picão (*Bidens pilosa* L.). In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 375 – 381, 2004.

CARVALHO, J. C. T. Calêndula (*Calendula officinalis* L.). In: CARVALHO, J., C., T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 257 – 265, 2004.

CARVALHO, J. C. T. Camomila (*Matricaria recutita* L.). In: CARVALHO, J., C., T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 257 – 265, 2004.

CASTAGNA, M.; TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; SANO, K.; KIKAWA U.; NISHIZUKA, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 7847 – 51, 1982.

CATLEY, M. C.; CHIVERS, J. E.; CAMBRIDGE, L. M.; HOLDEN, N.; SLATER, D. M.; STAPLES, K. J.; BERGMANN, M. W.; LOSER, P.; BARNES, P. J.; NEWTON, R. IL-1 β -dependent activation of NF-kB mediates PGE₂ release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. **Federation of European Biochemical Societies. Letters**, v. 547, p. 75 – 79, 2003.

CECHINEL FILHO, V.; DA SILVA, K. L.; DE SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, A. E.; YUNES, R. A.; GUIMARÃES, C. L.; VERDI, L. G.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F. 13-naringenina-118-4'-OMe-eriodictyol: a new potential analgesic agent isolated from *Rheedia gardneriana* leaves. **Zeitschrift für Naturforsch.**, 55c, p. 820 – 823, 2000.

CISNEROS, F. J.; JAYO, M.; NIEDZIELA, L. An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 355 – 364, 2005.

CLAUDINO, R. F.; KASSUYA, C. A. L.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B. Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E₂ – induced mouse paw edema. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, p. 611 – 318, 2006.

CONNOR, J. R.; MANNING, P. T.; SETTLE, S. L.; MOORE, W. M.; JEROME, G. M.; WEBBER, R. K.; TJOENG, F. S.; CURRIE, M. G. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **European Journal of Pharmacology**, v. 275, p. 15 – 24, 1995.

CORREA, C. R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 110 (1), p. 193 – 198, 1993.

CORRÊA, M. P. **Diccionario das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, IBDF, v. 6, p. 318 – 337, 1984.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature – insight review articles**, v. 420, p. 19 – 26, 2002.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 392 – 402, 1971.

CRUZ, A. J.; LEMOS, V. S.; DOS SANTOS, M. H.; NAGEM, T. J.; CORTES, S. F. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, v.13, p. 442–445, 2006.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 72–82, 2005.

DAMAS, J.; LIÉGEOIS, J. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 359, p. 220 – 227, 1999.

DA SILVA, S.; GUIMARÃES, C. L. Efeito analgésico de princípios ativos isolados do extrato bruto hidroalcoólico de *Rheedia gardneriana*. **Relatório apresentado ao programa de pesquisa PIBIC/CNPq**, Blumenau, 27 pp, 1997.

DATTI, F.; DATTI, M.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, N. A. Influence of chronic unpredictable stress on the allergic responses in rats. **Physiology & Behavior**, v. 77, p. 79– 83, 2002.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. II. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Journal of Natural Products**, v. 46 (5), p. 655 – 659, 1983.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; WATERMAN, P. G.; CRICHTON, E. G.; ALVES DE LIMA, R. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 23 (8), p. 1757 – 1759, 1984.

DI ROSA, M; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104 (1), p.15 – 29, 1971.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. **European Journal of Pharmacology**, v. 4, p. 340 – 342, 1968.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G.P., CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69 – 91, 2002.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 125 – 131, 1995.

DYKE, T. E. V.; SERHAN, C. N. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. **Journal of Dental Research**, v. 82(2), p. 82 – 90, 2003.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1317 – 1327, 2003.

FERREIRA, J.; TRICHÊS, K. M.; MEDEIROS, R.; CABRINI, D. A.; MORI, M. A. S.; PESQUERO, J. B.; BADER, M.; CALIXTO, J. B. The critical role of kinin B₁ receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. **Resultados não publicados**.

FERREIRA, J.; TRICHÊS, K. M.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the nociception produced by protein kinase c activation in mice. **Pain**, v. 117, p. 171 – 181, 2005.

FILION, M. C.; PHILLIPS, N. C. Anti-inflammatory activity of cationic lipids. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 551 – 557, 1997.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201 (5), p. 671 – 674, 2005.

FRÖDE, T.; SOUZA, G. E. P.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF- α and IL-1 β in the inflammatory responses Induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13 (3), p. 162 – 168, 2001.

FRUTUOSO, V. S.; MONTEIRO, M. M.; AMENDOEIRA, F. C.; ALMEIDA, A. L. F.; NASCIMENTO, D. D.; BÉRENGER, A. L. R.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C. Analgesic and anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Rheedia longifolia* Planch & Triana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102(1), p. 91 – 96, 2007.

GERTSCH, J.; RADUNER, S.; ALTMANN, K. H. New natural noncannabinoid ligands for cannabinoid type-2 (CB2) receptors. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v. 26 (5-6), p. 709 – 730, 2006.

GIL, B.; SANZ, M. J.; TERCENIO, M. C.; GUNASEGARAN, R.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M. J. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 733 – 740, 1997.

GILLIGAN, J. P.; LOVATO, S. J.; ERION, M. D.; JENG, A. Y. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. **Inflammation**, v. 18, p. 285 – 292, 1994.

GILROY, D. W. The endogenous control of acute inflammation – from onset to Resolution. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies / Inflammatory and musculoskeletal diseases**, v. 1(3), p. 313 – 319, 2004.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory Resolution: New Opportunities for Drug Discovery. **Nature Reviews – Drug Discovery**, v. 3, p. 401 – 416, 2004.

GÖK, S.; ÖNAL, A.; ÇINAR, M. G.; EVINÇ, A. The antinociceptive effect of leukotriene D₄ receptor antagonist, MK-571, in mice: possible involvement of opioidergic mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 386, p. 195 – 200, 1999.

GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M. T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 89 – 98, 2005.

GUIMARÃES, C. L.; LUZZI, R.; SIMIONATTO, E. L. Atividade vasodilatadora induzida pelo extrato hidroalcoólico de *Rheedia gardneriana* na aorta isolada de rato. **XI Reunião Anual da FESBE**, Caxambu, MG, p. 10075, 1996a.

GUIMARÃES, C. L.; OTUKI, M. F.; BEIRITH, A.; CABRINI, D. A. Uma revisão sobre o potencial terapêutico da *Garcinia gardneriana* – NA. **Dynamis Revista Tecno-Científica**, v. 12 (48), p. 6 – 12, 2004.

GUIMARÃES, C. L.; SILVA FILHO, H. F.; TONELLO, J. F.; SIMIONATTO, E. L.; VERDI, L. G. Efeito antiinflamatório induzido pelo extrato hidroalcoólico de *Rheedia gardneriana* em modelos de pleurisia em ratos. **XI Reunião Anual da FESBE**, Caxambu, MG, p. 10067, 1996b.

GUSTAFSON, K. R.; MUNRO, M. H. G.; FULLER, R. W.; CARDELLINA, J. H. The Guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *G. ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, p. 10093-10102, 1992.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54 (4), p. 469 – 487, 2003.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67 – 202, 2002.

HAWKEY, C. J. COX-1 and COX-2 inhibitors. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 15 (5), p. 801 – 820, 2001.

HENDERSON, R. B.; HOBBS, J. A. R.; Mathies, M.; Hogg, N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. **Blood**, v. 102, (1), 2003.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 243 – 249, 1987.

HONG, J.; KWON, S. J.; SANG, S.; JU, J.; ZHOU, J. N.; HO, C. T.; HUANG, M. T.; YANG, C. S. Effects of garcinol and its derivatives on intestinal cell growth: Inhibitory effects and autoxidation-dependent growth-stimulatory effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42 (8), p. 1211 – 1221, 2007.

HONG, J.; SANG, S.; PARK, H. J.; KWON, S. J.; SUH, N.; HUANG, M. T.; HO, C. T.; YANG, C. S. Modulation of arachidonic acid metabolism and nitric oxide synthesis by garcinol and its derivatives. **Carcinogenesis**, v. 27 (2), p. 278 – 286, 2006.

HORIUCHI, M.; SEYAMA, W. Antiinflammatory and antiallergic activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff. **Journal of Health Science**, v. 52 (6), p. 711 – 717, 2006.

IANARO, A.; O'DONNELL, C. A.; DI ROSA, M.; LIEW, F. Y. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances IL-10 production in carragennan-induced oedema in mice. **Immunology**, v. 82, p. 370 – 375, 1994.

KEEBLE, J.; BLADES, M.; PITZALIS, C.; DA ROCHA, F. A. C.; BRAIN, D. S. The role of substance P in microvascular responses in murine joint inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 1059 – 1066, 2005.

KHAN, I. A. Issues related to botanicals. **Life Sciences**, v. 78, p. 2033 – 2038, 2006.

KIS, B.; SNIPES, J. A.; BUSIJA, D. W. Acetaminophen and the Cyclooxygenase-3 Puzzle: Sorting out Facts, Fictions, and Uncertainties. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 315 (1), p.1–7, 2005.

KOBAYASHI, Y.; NAKANO, Y.; INAYAMA, K.; SAKAI, A.; KAMIYA, T. Dietary intake of the flower extracts of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) inhibited compound 48/80-induced itch-scratch responses in mice. **Phytomedicine**, v. 10 (8), p. 657 – 664, 2003.

KOBAYASHI, Y.; TAKAHASHI, R.; OGINO, F. Antipruritic effect of the single oral administration of German chamomile flower extract and its combined effect with antiallergic agents in ddY mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101 (1-3), p. 308 – 312, 2005.

KOVACS, E.J., RADZIOCH, D., YOUNG, H.A. & VARESIO, L. Differential inhibition of IL-1 and TNF-alpha mRNA expression by agents which block second messenger pathway in murine macrophages. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 3101 – 3105, 1988.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 49 – 79, 2005.

LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; HAKANSSON, L. D.; VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, v. 59, p. 793 – 805, 2004.

LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601 – 606, 1969.

LIAO, C. H.; HO, C. T.; LIN, J. K. Effects of garcinol on free radical generation and NO production in embryonic rat cortical neurons and astrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329 (4), p. 1306 – 1314, 2005.

LIMA, L. M.; CARVALHO, J., C., T. Equinacea (*Echinacea angustifolia* L.). In: CARVALHO, J., C., T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 291 – 303, 2004.

LIMA, L. M.; CARVALHO, J., C., T. Garra do diabo (*Harpagophytum procumbens* D. C.). In: CARVALHO, J., C., T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 315 – 322, 2004.

LUZZI, R.; FURLAN, S. P.; GUIMARÃES, C. L. Atividade analgésica do extrato bruto hidroalcoólico de *Rheedia gardneriana*. **IX Reunião Anual da FESBE**, livro de resumos, nº 6.20, 1994.

LUZZI, R.; GUIMARÃES, C. L.; VERDI, L. G.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL FILHO, V. Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. **Phytomedicine**, v. 4, p. 139 – 142, 1997.

LUZZI, R.; GUIMARÃES, C. L. Atividade antinociceptiva do extrato bruto hidroalcoólico de *Rheedia gardneriana* em alguns modelos experimentais de dor. **V Seminário Catarinense de Iniciação Científica**, Livro de Resumos, p. 252, 1995.

MATSUMOTO, K.; AKAO, Y.; KOBAYASHI, E.; ITO, T.; OHGUCHI, K.; TANAKA, T.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y. Cytotoxic benzophenone derivatives from *Garcinia* species display a strong apoptosis-inducing effect against human

leukemia cell lines. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26 (4), p. 569 – 571, 2003.

MAJERUS, P. W.; TOLLEFSEN, D. M. Anticoagulantes, trombolíticos e fármacos antiplaquetários. In: **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, p. 1141 – 1155, 2003.

MCCARTNEY-FRANCIS, N.; ALLEN, J. B.; MIZEL, D. E.; ALBINA, J. E.; XIE, Q.; NATHAN, C. F.; WAHL, S. M. Suppression of arthritis by an inhibition of nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 749 – 754, 1993.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytoterapy Research**, v. 20 (7), p. 519 – 530, 2006.

MOHR, D. C.; PELLETIER, D. A temporal framework for understanding the effects of stressful life events on inflammation in patients with multiple sclerosis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 20, p. 27 – 36, 2006.

MORROW, J. D.; ROBERTS II, L. J. Autacóides derivados dos lipídeos – Eicosanóides e fator de ativação das plaquetas. In: **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, p. 503 – 515, 2003.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Pharmacology**, v. 128, p. 853 – 859, 1999.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature – insight review articles**, v. 420 (19/26), p. 846 – 852, 2002.

NEUKIRCH, H.; D'AMBROSIO, M.; SOSA, S.; ALTINIER, G.; DELLA LOGGIA, R.; GUERRIERO, A. Improved anti-inflammatory activity of three new terpenoids derived, by systematic chemical modifications, from the abundant triterpenes of the flowery plant *Calendula officinalis*. **Chemical Biodiversity**, v. 2 (5), p. 657 – 671, 2005.

NEVES, J. S.; COELHO, L. P.; CORDEIRO, R. S.; VELOSO, M. P.; E SILVA, P. M.; DOS SANTOS, M. H.; MARTINS, M. A. Antianaphylactic Properties of 7-Epiclusianone, a Tetraprenylated Benzophenone Isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Médica**, Jun 11, 2007 [Epub ahead of print].

NYSTROM, P. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and etiology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41 (A), p. 1–7, 1998.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **TRENDS in Immunology**, v.26 (3), p. 158 – 165, 2005.

CICEK ÖZDÖL, C. N.; MELLI, M. Formation of 8-isoprostaglandin $F_{2\alpha}$ and prostaglandin E_2 in carrageenan-induced air pouch model in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 506 (2), p. 189 – 197, 2004.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiology Reviews**, v. 87, p. 315 – 424, 2007.

PERAZZO, F. F. Unha de gato (*Uncaria tomentosa* (Willd) DC.). In: CARVALHO, J., C., T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 423 – 430, 2004.

PEREIRA, R. L. C.; IBRAHIM, T.; LUCCHETTI, L.; DA SILVA, A. J. R.; DE MORAES, V. L. G. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology**, v. 43, p. 31 – 37, 1999.

PEREIRA, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. Antiinflammatory effects of *Tacrolimus* in a mouse model of pleurisy. **Transplant Immunology**, v. 16, p. 105 – 111, 2006.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331 – 338, 2004.

QU, X. F.; HAYASHI, M.; YAMAKI, K.; OH-ISHI, S. Assessment of vascular permeability increase in the mouse by dye leakage during paw edema. **Japan Journal of Pharmacology**, v. 52, p. 500 – 503, 1990.

RADUNER, S.; MAJEWSKA, A.; CHEN, J-Z.; XIE, X-Q.; HAMON, J.; FALLER, B.; ALTMANN, K-H.; GERTSCH, J. Alkylamides from Echinacea Are a New Class of Cannabinomimetics - cannabinoid type 2 receptor-dependent and – independent immunomodulatory effects. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281 (20), p. 14192 – 14206, 2006.

RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCIA, A.; RODRÍGUEZ, C. A.; RIVERO, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 241 – 246, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 246 – 276, 2004.

RECIO, M. C.; GINET, R. M.; URIBUN, L.; MÁÑEZ, S.; CERDÁ, M.; DE LA FUENTE, J. R.; RÍOS, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, v. 66 (26), p. 2509 – 2518, 2000.

RICHARDSON, J. D.; VASKO, M. R. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302 (3), p. 839 – 845, 2002.

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgésico-Antipiréticos, agentes antiinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, p. 517 – 550, 2003.

ROBSON, N. Studies in the genus *Hypericum L.* (Guttiferae). **Trigynobrathys**, p. 1 – 151, 1990.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M. A.; STOECKLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1381 – 1385, 1994.

ROCHA E SILVA, M.; GARCIA LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In: **International series of Monographs in Pure and Applied Biology**, Modern Trends in Physiological Sciences, v. 37, p. 1 – 47, 2006.

RODRIGUES, C. A.; OLIVEIRA, A. E.; WILLAIN, F. R.; CECHINEL FILHO, C. L.; GUIMARÃES, C. L.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Separation of biflavanoids from *Rheedia gardneriana* using chitin-Fe complex as stationary phase. **Pharmazie**, v. 55 (9), p. 699 – 700, 2000.

SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, v. 331, p. 43 – 52, 1997.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; 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 in carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829 – 838, 1996.

SANDERS, V. M. Interdisciplinary research: Noradrenergic regulation of adaptive immunity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 20, p. 1 – 8, 2006.

SANG, S.; LIAO, C. H.; PAN, M. H.; ROSEN, R. T.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K.; HO, C. T. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol with peroxy radicals and their antitumor activities. **Tetrahedron**, v. 58, p. 10095 – 10102, 2002.

SANTOS, M. H.; SPEZIALI, N. L.; NAGEM, T.; OLIVEIRA, T. T. Epiclusianone: a new natural product derivative of bicyclo [3.3.1] nonane-2,4,9-trione. **Acta Crystallographica Section C**, v.54, p. 1990 – 1992, 1998.

SANZ, M. J.; FERRANDIZ, M. L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M. C.; GIL, B.; BUSTOS, G.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**, v.24 (7), p. 689 – 699, 1994.

SARTI, S. J.; CARVALHO, J., C., T. Fitoterapia e fitoterápicos. In: CARVALHO, J., C., T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 13 – 38, 2004.

SAWYNOK, J., Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 1–20, 2003.

SAYAR, K.; MELLI, M. Effect of combination of misoprostol and indomethacin on eicosanoid production in carrageenan-induced air pouch inflammation in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 369, p. 365 – 371, 1999.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Hormônio adrenocorticotrópico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações

dos hormônios adrenocorticais. In: **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, p. 1241 – 1261, 2003.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 12013 – 12017, 1994.

SEKUT, L.; YARNALL, D.; STIMPSON, S. A.; NOEL, L. S.; BATEMAN-FITE, R.; CLARK, R. L.; BRACKEEN, M. F.; MENIUS, J. A.; CONNOLLY, K. M. Anti-inflammatory activity of phosphodiesterase (PDE) IV inhibitors in acute and chronic models of inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 100, p. 126 – 132, 1995.

SELVI, A. T.; JOSEPH, G. S.; JAYAPRAKASHA, G. K. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. **Food Microbiology**, v. 20, p. 455 – 460, 2003.

SETTY, A.R.; SIGAL, L.H. Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 34, p. 773 – 784, 2005.

SEVERN, A.; WAKELAM, M. J. O.; LIEW, F. Y. The role of protein kinase C in the induction of nitric oxide synthesis by murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 188, p. 997 – 1002, 1992.

SHAPIRA, L.; TAKSHIBA, S.; CHAMPAGNE, C.; AMAR, S.; VAN DYKE, T. E. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 1818 – 1824, 1994.

SHARMA, M.; ARNASON, J. T.; BURT, A.; HUDSON, J. B. Echinacea extracts modulate the pattern of chemokine and cytokine secretion in rhinovirus-infected and uninfected epithelial cells. **Phytotherapy Research**, v. 20 (2), p. 147 – 152, 2006.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385–405, 2004.

SHIPOCHLIEV, T.; DIMITROV, A.; ALEKSANDROVA, E. Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. **Veterinarno-meditsinski Nauki**, v. 18 (6), p. 87 – 94, 1981.

SILVA, C. M.; CARVALHO, J., C., T. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). In: CARVALHO, J., C., T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 323 – 325, 2004.

SUGISHITA, E.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **Journal of Pharmacobiodynamics**, v. 8, p. 565 – 575, 1981.

SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L.; NEPOMUCENO, D. C.; YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts - Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 287 – 290, 2006.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature– insight review articles**, v. 420 (19/26), p. 852 – 859, 2002.

TRATSK, K. S.; CAMPOS, M. M.; VAZ, Z. R.; FILHO, V. C.; SCHLEMPER, V. YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Anti-allergic effects and oedema inhibition

caused by the extract of *Drymis winteri*. **Inflammation Research**, v. 46, p. 509 – 514, 1997.

UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers. **Journal of Natural Products**, v. 69 (12), p.1692 – 1696, 2006.

VAJJA, B. N. L.; JULURI, S.; KUMARI, M.; KOLE, L.; CHAKRABARTI, R.; JOSHI, V. D. Lipopolysaccharide-induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 901 – 909, 2004.

VAN MIERT, A. S. J. P. A. M. Presente concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. **Veterinary Research Communications**, v. 26 (2), p. 111 – 126, 2002.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 327 – 363, 2001.

VARIER, R. A.; SWAMINATHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, K.; KUNDU, T. K. Implications of small molecule activators and inhibitors of histone acetyltransferases in chromatin therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 68 (6), p. 1215 – 1220, 2004.

VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G.; MONTANHER, A. B. P.; BRIGHENTE, I. M.C.; JÚNIOR, A. S.; SMÂNIA, E. F. A.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 360 – 363, 2004.

VIANA, A. F.; HECKLER, A. P.; FENNER, R.; RATES, S. M. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 631 – 634, 2003.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166 (1), p. 96 – 103, 1969.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R.; VENABLE, A. L.; MCKENZIE, K. K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Federation Proceedings**, v. 46, p. 118 – 126, 1987.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 349 – 374, 2000.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. **News in Physiological Sciences**, v. 15, p. 107 – 113, 2000.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99 (21), p. 13371–13373, 2002.

WATERER, G. W.; WUNDERINK, R. Science review: Genetic variability in the systemic inflammatory Response. **Critical Care**, v. 7 (4), p. 308 – 314, 2003.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544 – 547, 1962.

WITKAMP, R; MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **The Veterinary Quarterly**, v. 22(1), p.11 – 16, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **Traditional Medicine Strategy 2002– 2005**. Geneva, 2002.

YAMAMOTO, A.; NAKAMURA, K.; FURUKAWA, K.; KONISHI, Y.; OGINO, T.; HIGASHIURA, K.; YAGO, H.; OKAMOTO, K.; OTSUKA, M. A new nonpeptide tachykinin NK1 receptor antagonist isolated from the plants of *Compositae*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50 (1), p. 47 – 52, 2002.

YOSHIDA, K.; TANAKA, T.; HIROSE, Y.; YAMAGUCHI, F.; KOHNO, H.; TOIDA, M.; HARA, A.; SUGIE, S.; SHIBATA, T.; MORI, H. Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. **Cancer Letters**, v. 221 (1), p. 29 – 39, 2005.

YUHKI, K.; UENO, A.; NARABA, H.; KOJIMA, F.; USHIKUBI, F.; NARUMIYA, S.; OH-ISHI, S. Prostaglandin receptors EP₂, EP₃ e IP mediate exudate formation in carrageenin-induced pleurisy. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, p. 1218 – 1224, 2004.

ZHOU, H.; DENG, Y.; XIE, Q. The modulatory effects of the volatile oil of ginger on the cellular immune response in vitro and in vivo in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 301 – 305, 2006.