

LARYSSA KATHLIN RAUH

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DA *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA 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-orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

CURITIBA
2008

*As pessoas sempre culpam as circunstâncias por aquilo que acontece com elas.
Não acredito em circunstâncias.
As pessoas que progridem na vida são aquelas que acordam pela manhã e procuram as circunstâncias que desejam, e se não as encontram, as criam.*

Jorge Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

A Deus, dono de todo conhecimento e sabedoria, por conceder essa conquista, por estender suas mãos nos momentos de desânimo e por me apresentar a pessoas tão especiais e auxiliadoras no decorrer do mestrado como a Alliete, Evelise, Cíntia e Shirley.

Aos meus Pais, Nelso e Mara, e ao meu irmão Alisson, por tudo que representam na minha vida e pela compreensão nos momentos de ausência.

Aos companheiros de laboratório e colegas de mestrado, pelo auxílio e pelos momentos alegres que proporcionaram, com certeza vocês tornaram tudo mais leve e agradável.

Ao grande Fernandinho “do citômetro”, por ter sido tão prestativo e dedicado me auxiliando em alguns experimentos.

Aos meus orientadores, Daniela Cabrini e Michel Otuki, pelo exemplo de competência e por despertarem em mim a paixão pela pesquisa.

Ao meu querido “Nemo”, Gledson, pelo carinho e incentivo, você é mais do que especial.

E principalmente a Vó Duda (*in memoriam*) pelo exemplo de integridade, sabedoria e amor.

RESUMO

A *Vernonia scorpioides* Lam. Persons (Asteraceae) é uma planta de ocorrência comum na mata atlântica do Brasil, sendo utilizada topicamente na medicina tradicional para tratar uma variedade de afecções cutâneas. Em sua composição fitoquímica estão presentes as lactonas sesquiterpênicas e flavonóides, nos quais já demonstraram atividade antiinflamatória em vários estudos. O presente estudo teve por objetivo a avaliação da atividade antiinflamatória tópica do extrato etanólico da *Vernonia scorpioides* (EEVS), bem como das frações e do composto isolado luteolina sobre os processos inflamatórios cutâneos agudos e crônicos, utilizando o modelo de edema de orelha em camundongos (Swiss fêmeas e machos, pesando entre 25 a 30 g) induzido pela aplicação tópica do 12-O-tetradecanoil forbol acetato (TPA), ácido araquidônico (AA), capsaicina, fenol, histamina, oxazolona e óleo de cróton. A aplicação tópica do EEVS inibiu o edema induzido pelo TPA de maneira dose-dependente, com uma $DI_{50}=0,31$ (0,21-0,45) mg/orelha e I_{max} de $80\pm 5\%$ (1 mg/orelha). A infiltração de neutrófilos, através da avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO), também foi inibida ($I_{max} = 77\pm 8\%$, 1 mg/orelha) nesse modelo, sendo esses resultados confirmados na análise histológica. Todas as frações testadas (diclorometano, acetato, acetato enriquecido e hexano), assim como o composto isolado luteolina, promoveram um efeito anti-edematogênico ($70\pm 5\%$, $57\pm 5\%$, $53\pm 4\%$, $35\pm 8\%$ e $44\pm 11\%$, respectivamente). Da mesma forma que o EEVS, a fração diclorometano e acetato também inibiram de maneira dose-dependente a formação do edema, bem como a atividade da MPO. O EEVS e a luteolina reduziram a formação de ROS em amostras de orelhas submetidas à aplicação do TPA. A aplicação tópica do EEVS no modelo do AA também resultou na redução do edema com uma $DI_{50}=0,68$ (0,41-1,13) mg/orelha e $I_{max} = 60\pm 8\%$ (1 mg/orelha). O EEVS aplicado topicamente foi capaz de alterar a formação do edema em outros modelos de inflamação cutânea aguda, como no modelo de edema de orelha induzido pela capsaicina ($25\pm 7\%$), fenol ($88\pm 6\%$) e histamina ($25\pm 7\%$). No modelo de hipersensibilidade tardia, o EEVS se mostrou efetivo já nas primeiras 24 h após o desafio com a oxazolona quando o tratamento foi realizado

somente na fase efetora ou em ambas as fases (indução e efetora), com uma inibição de 63,4% e 42,9%, respectivamente, mantendo esse efeito até a última medida do edema (96 h). A atividade da MPO foi inibida de forma significativa pelo EEVS quando avaliada 24 h após a re-exposição à oxazolona ($53\pm 16\%$). No entanto, o EEVS não atuou sobre a proliferação dos linfócitos CD_4^+ e CD_8^+ presentes no linfonodo. No modelo de inflamação crônica da pele, o EEVS reduziu o edema e a hiperproliferação epidérmica após a aplicação repetida do óleo de cróton (inibição de $31 \pm 2\%$ no nono dia de tratamento). O EEVS também inibiu a atividade da MPO, porém não foi capaz de atuar sobre a atividade da n-acetil- β -D glucosaminidase (NAG). Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que o EEVS é efetivo na inibição de processos inflamatórios cutâneos agudos e crônicos, bem como na resposta inflamatória envolvida na reação de hipersensibilidade do tipo tardia, e que o efeito antiinflamatório do EEVS provavelmente resulta da ação sinérgica de vários compostos que promovem a redução da síntese de metabólitos do AA e a redução de ROS na derme. Assim, o presente trabalho valida o uso popular da *V. scorpioides* sobre processos inflamatórios cutâneos e introduz a *V. scorpioides* como uma planta de significativo interesse para o desenvolvimento de um novo antiinflamatório tópico.

Palavras-chave: *Vernonia scorpioides*; Asteraceae; edema de orelha, inflamação cutânea.

ABSTRACT

The *Vernonia scorpioides* Lam. (Asteraceae) Persons, is a native Brazilian medicinal plant commonly used topically in the folk medicine to treat some skin disorders, including chronic ulcers, allergies, irritations and pruritus. Some compounds as lactones sesquiterpenes and flavonoids are present in this specie and have been presenting anti-inflammatory activities. The aim of the present study was to evaluate the topical anti-inflammatory activity of *Vernonia scorpioides* in acute and chronic skin inflammation, using the mice ear oedema model (female and male Swiss, 25-30 g) induced by topical application of 12-O-tetradecanoilforbol acetate (TPA), arachidonic acid (AA), capsaicin, phenol, histamine, oxazolone and croton oil. The topical application of ethanolic extract of *V. scorpioides* (EEVS) caused a dose-related inhibition of oedema in TPA-induced ear oedema model, showing a $DI_{50}=0,31$ (0,21-0,45) mg/ear and $80\pm 5\%$ of inhibition (1 mg/ear). The neutrophils infiltration, evaluated by myeloperoxidase (MPO) activity, also was inhibited in this acute model ($I_{max}=77\pm 8\%$, 1 mg/ear), confirmed by histological analysis. All the fractions tested, dichlorometane (DCM), acetate, enriched acetate and hexane, as well the isolated compound luteoline, promoted an anti-oedematogenic effect ($70\pm 5\%$, $57\pm 5\%$, $53\pm 4\%$, $35\pm 8\%$ e $44\pm 11\%$, respectively). As shown by EEVS, the DCM and acetate fraction also promoted a dose-related inhibition of ear oedema and the MPO activity induced by TPA. The EEVS and luteoline reduced the ROS production in the ear treated with TPA. The topical application of EEVS also resulted in reduction of the AA-induced ear oedema [$DI_{50}=0,68$ (0,41-1,13) mg/ear and $I_{max}=60\pm 8\%$ (1 mg/ear)]. The EEVS applied topically was able to inhibit the oedema formation when it was caused by capsaicin, phenol and histamine ($25\pm 7\%$, $88\pm 6\%$ and $25\pm 7\%$, respectively). In the delayed hypersensitivity model, the EEVS showed to be effective in the first 24 h after the challenge with oxazolone when the treatment occurred in the effector phase or both phases (induction and effector), with an inhibition of 63,4% and 42, 9%, respectively, sustaining this effect until the last measurement (96 h). The MPO activity was inhibited by EEVS when it was evaluated 24 h after the challenge with oxazolone ($53\pm 16\%$). However, EEVS did not show any effect on lymphocytes CD_4^+ and

CD₈⁺ proliferation in the lymphonode. In the inflammation chronic model, the EEVS reduced the oedema formation and the epidermal hiperproliferation (inhibition of 31 ± 2% in day 9). The EEVS also inhibited the MPO activity, but it was not able to reduce the n-acetil-β-D glucosaminidase activity (NAG). In conclusion, these results taken together suggest that EEVS is effective to inhibit acute and chronic inflammatory responses of skin, as well as the inflammatory process involved in delayed hypersensitivity reaction and suggests that the *V. scorpioides* mechanism of action results from a synergic action of several compounds that probably promotes de synthesis reduction of AA metabolites and reduction of ROS. Thus, it validates the traditional use of *V. scorpioides* as a medicinal plant and introduces this plant as interesting to the development of a new topical anti-inflammatory.

Key words: *Vernonia scorpioides*; Asteraceae; ear oedema; skin inflammation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Estrutura e Fisiologia da pele.....	2
1.2. Inflamação cutânea.....	7
1.3. Doenças inflamatórias cutâneas e tratamento farmacológico.....	12
1.4. Plantas medicinais como alvo de novos antiinflamatórios tópicos.....	16
1.5. <i>Vernonia scorpioides</i>	20
1.5.1. Aspectos Botânicos e Etnofarmacológicos.....	20
1.5.2. Descrição Fitoquímica.....	22
1.4.3. Estudos Farmacológicos com a <i>Vernonia scorpioides</i>	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Extrato e frações da <i>Vernonia scorpioides</i>	30
3.2. Animais e manutenção.....	30
3.3. Drogas e soluções.....	31
3.4. Protocolos experimentais (Modelo de edema de orelha).....	32
3.4.1. Avaliação do edema de orelha.....	32

3.4.2. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA.....	32
3.4.3. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do ácido araquidônico...	33
3.4.4. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de Fenol.....	33
3.4.5. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina.....	34
3.4.6. Edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica da histamina.....	34
3.4.7. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de oxazolona.....	35
3.4.8. Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	35
3.5. Medida da atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO).....	36
3.6. Medida da atividade enzimática da n-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG).....	37
3.7. Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico da <i>V. scorpioides</i>.....	38
3.8. Análise do marcador de superfície celular da população de leucócitos por citometria de fluxo.....	38
3.9. Análise de marcadores de superfície celular de subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo.....	39
3.10. Análise histológica.....	40
3.11. Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Efeito do extrato etanólico da <i>Vernonia scorpioides</i> (EEVS) no modelo de edema de orelha induzido por TPA.....	42
4.2. Efeito tópico das diferentes frações da <i>Vernonia scorpioides</i> no modelo de edema de orelha induzido por TPA.....	48
4.3. Efeito antioxidante do extrato etanólico da <i>Vernonia scorpioides</i> (EEVS) e do composto isolado luteolina.....	52
4.4. Efeito do extrato etanólico da <i>Vernonia scorpioides</i> (EEVS) no modelo de	

edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	52
4.5. Efeito do extrato etanólico da <i>Vernonia scorpioides</i> (EEVS) no modelo de edema de orelha induzido por Fenol.....	53
4.6. Efeito do extrato etanólico da <i>Vernonia scorpioides</i> (EEVS) no modelo de edema de orelha induzido por capsaicina.....	54
4.7. Efeito do extrato etanólico da <i>Vernonia scorpioides</i> (EEVS) no modelo de edema de orelha induzido por histamina.....	55
4.8. Efeito do extrato etanólico da <i>Vernonia scorpioides</i> (EEVS) no modelo de edema de orelha induzido por oxazolona.....	56
4.9. Efeito do extrato etanólico da <i>Vernonia scorpioides</i> (EEVS) no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	61
4.10. Avaliação da estabilidade do extrato etanólico da <i>Vernonia scorpioides</i> (EEVS).....	67
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	119

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema simplificado de uma seção transversal da pele.....	2
FIGURA 2	Esquema simplificado de uma seção transversal da epiderme...	3
FIGURA 3	<i>Vernonia scorpioides</i> Lam. (Asteraceae).....	21
FIGURA 4	<i>Vernonia scorpioides</i> Lam. (Asteraceae). A- Vegetal florido, C- Inflorescência característica, D – folhas, E- Ramo não florido...	21
FIGURA 5	Compostos isolados e caracterizados a partir das folhas e inflorescências da <i>Vernonia scorpioides</i>	23
FIGURA 6	Hirsutinólídeos isolados da <i>Vernonia tifflosculosa</i>	24
FIGURA 7	Curva dose-resposta do EEVS no edema de orelha induzido por TPA.....	43
FIGURA 8	Efeito do EEVS sobre o edema de orelha e aumento na atividade da MPO induzido por TPA.....	44
FIGURA 9	Efeito do EEVS sobre a atividade da enzima MPO <i>in vitro</i>	45
FIGURA 10	Análise histológica do efeito do EEVS sobre o edema e infiltrado leucocitário no modelo de edema de orelha induzido por TPA.....	46
FIGURA 11	Efeito do EEVS por via oral sobre o edema de orelha induzido por TPA.....	48
FIGURA 12	Efeito do EEVS e das frações da <i>Vernonia scorpioides</i> sobre o edema de orelha induzido por TPA.....	49
FIGURA 13	Curva dose-resposta de diferentes frações obtidas do EEVS no edema de orelha induzido por TPA.....	50
FIGURA 14	Efeito da fração Ace e DCM da <i>Vernonia scorpioides</i> sobre o aumento da atividade da MPO induzida por TPA.....	51
FIGURA 15	Efeito antioxidante do EEVS e do composto isolado luteolina	

	em modelo de edema de orelha induzido por TPA.....	52
FIGURA 16	Curva dose-resposta do EEVS no edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	53
FIGURA 17	Efeito do EEVS no edema de orelha induzido por fenol.....	54
FIGURA 18	Efeito do EEVS no edema de orelha induzido por capsaicina....	55
FIGURA 19	Efeito do EEVS no edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica de histamina.....	56
FIGURA 20	Efeito do EEVS no modelo de hipersensibilidade tardia induzida pela oxazolona.....	58
FIGURA 21	Efeito do EEVS sobre a proliferação de linfócitos T CD ₄ na hipersensibilidade do tipo tardia.....	59
FIGURA 22	Efeito do EEVS sobre a proliferação de linfócitos T CD ₈ na hipersensibilidade do tipo tardia.....	60
FIGURA 23	Efeito do EEVS sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no modelo de hipersensibilidade do tipo tardia induzida por oxazolona.....	61
FIGURA 24	Efeito do EEVS no edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	63
FIGURA 25	Análise histológica do efeito do EEVS sobre o edema, infiltrado leucocitário e hiperproliferação epidérmica no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla do óleo de cróton.....	65
FIGURA 26	Efeito do EEVS sobre a infiltração de leucócitos totais no tecido durante o processo inflamatório crônico.....	66
FIGURA 27	Avaliação da estabilidade do EEVS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico
AceE – Acetato enriquecido
Acet - Acetato
AP-1 – Proteína ativadora-1
cAMP – 3', 5' - Adenosina monofosfato cíclico
cGMP - Guanosina monofosfato cíclico
CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cys³⁸ – Cisteína 38
Cys¹²⁰ – Cisteína 120
COX-1 – Cicloxigenase 1
COX-2 – Cicloxigenase 2
DCM – Diclorometano
Dexa – Dexametasona
DI₅₀ – Dose do EEVS ou frações que reduziram a resposta em 50%
DMSO - Dimetilsulfóxido
EEVS – Extrato Etanólico da *Vernonia scorpioides*
EPP – Etilfenilpropiolato
FDA – Food and Drug Administration
Hex - Hexano
HTBA – Hexadeciltrimetilamônia
IgE – Imunoglobulina E
IFN-γ – Interferon gama
IL – Interleucina
iNOS – Óxido Nítrico Sintetase induzida
KGF – Fator de Crescimento dos Queratinócitos
LS – Lactonas Sesquiterpênicas
LOX – Lipoxigenase
5-LOX – 5-lipoxigenase

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
mDO – mili-Densidade Óptica
MHC I - Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo I
MHC II - Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo II
MPO – mieloperoxidase
NAG – N-acetil- β -D glucosaminidase
NF- κ B – Fator de Transcrição Nuclear- Kappa B
NO – Óxido Nítrico
NOS – Óxido Nítrico Sintetase
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão fosfato de sódio
PAF – Fator de agregação plaquetária
PG - Prostaglandina
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PK - Proteína quinase
PKA – Proteína quinase A
PKC – Proteína quinase C
PLA₂ – Fosfolipase A₂
PMN - Polimorfonucleares
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio
Th – T helper
TMB – Tetrametilbenzidina HCl
TGF β 1 – Fator de crescimento tumoral β 1
TNF α – Fator de necrose tumoral
TPA – 12-O-tetradecanoilforbol acetato
Tyr³⁶ – Tirosina 36
UV – Ultravioleta
VECF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura e Fisiologia da Pele

A pele é um órgão complexo que isola e recobre aproximadamente 2 m² da superfície corpórea e representa 15% do peso corporal, sendo constituída por três camadas de estrutura e propriedades distintas: a epiderme, derme e hipoderme (figura 1), dispostas e inter-relacionadas de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções. A estrutura, as propriedades e a composição da pele variam consideravelmente em relação à idade. O sistema tegumentar (pele e derivados epidérmicos) desempenha várias funções: protege contra lesões físicas, químicas e biológicas, impede a perda de água, promove as sensações de dor, pressão, tato e temperatura, sintetiza certos hormônios (dehidrotestosterona) e vitaminas (vitamina D), promove a regulação térmica, metaboliza xenobióticos e excreta certas substâncias através das glândulas sudoríparas (CHUONG et al., 2002; HAAKE et al., 2000; SAMPAIO et al., 2000; SHAEFER e REDELMEIER, 1996; ROSS et al., 1993).

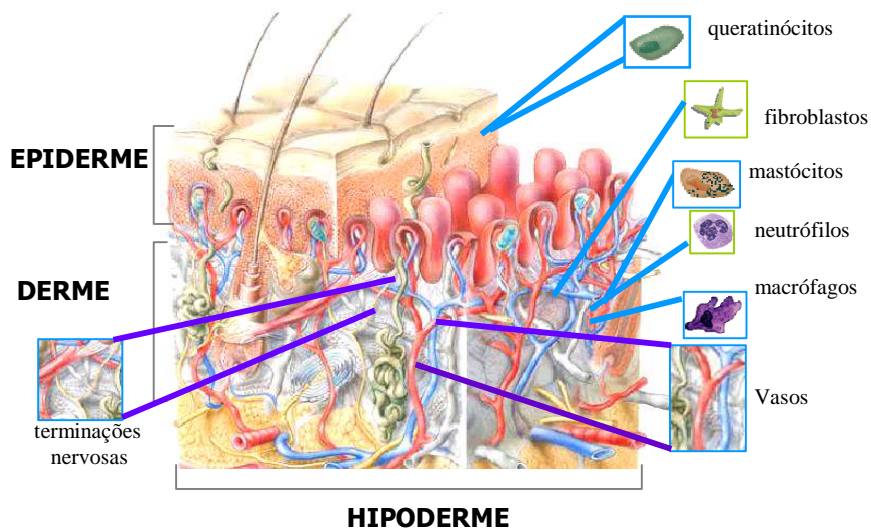


Figura 1: Esquema simplificado de uma seção transversal de pele demonstrando as três camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e os tipos celulares presentes. **Fonte:** Adaptado de Freinkeil e Woodley, 2001.

A camada superior da pele é a epiderme, sendo esta constituída por um epitélio estratificado pavimentoso cuja espessura apresenta variações topográficas ao longo do organismo (CANDI et al., 2005; SAMPAIO et al., 2000).

A epiderme é classificada basicamente em quatro camadas (figura 2), cada uma apresentando uma função distinta (NORRIS, 2004; ROSS et al., 1993):

- 1) Camada córnea - atua como uma grande barreira à penetração de organismos externos e toxinas, além de prevenir a perda de água;
- 2) Estrato granuloso – nessa camada inicia-se o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose diferenciando-se em corneócitos;
- 3) Estrato espinhoso – os queratinócitos presentes nessa camada são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina (queratinização) que interagem com os desmossomas, síntese de agentes antioxidantes (glutathione redutase, peroxidase, catalase), citocinas, quimiocinas, queratohialina, etc.
- 4) Estrato basal - camada mais profunda responsável pela proliferação celular, sendo essa camada resistente ao processo apoptótico.

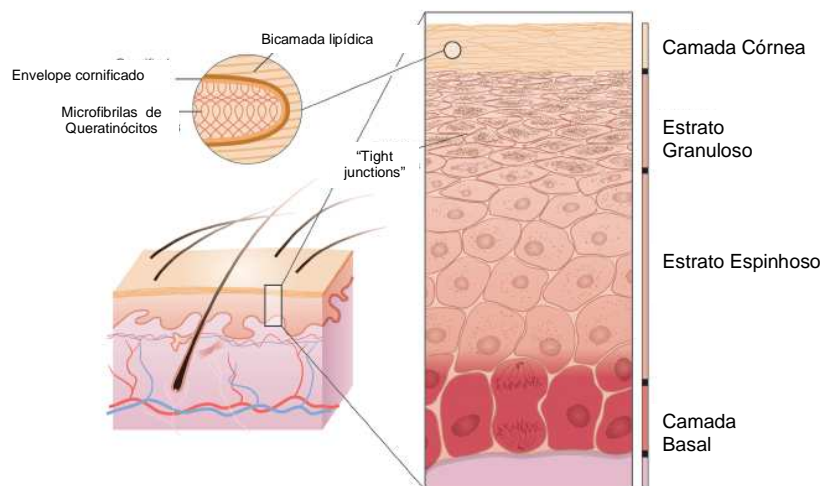


Figura 2: Esquema simplificado de uma secção transversal da epiderme. **Fonte:** Adaptado de Segre, 2006.

A epiderme é constituída de múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias. Aproximadamente 80-85% da epiderme é constituída de queratinócitos, 10-13 % de melanócitos, 4% de células de langerhans e 1% de células de Merckel (KOSTER e ROOP, 2004; FREINKEIL e WOODLEY, 2001). A manutenção do número de células na epiderme depende do balanço entre proliferação celular e morte celular (diferenciação/apoptose) dos queratinócitos. Esse processo é governado pela comunicação parácrina e autócrina via hormônios, fatores de crescimento e citocinas ou por comunicação intercelular via célula-célula e célula-matrix de adesão, ou ainda pela comunicação intercelular na região da “gap junction” (HAAS e HERLYN, 2005; HAAKE et al., 2000). A epiderme tem a capacidade de auto-renovação tanto sob condições homeostáticas como em condições nocivas, devido à presença de uma população celular mitoticamente ativa na camada basal. Em condições normais, a renovação epidérmica é balanceada pela descamação da camada córnea na superfície da pele, onde se verifica uma diferenciação celular progressiva, através do processo de queratinização e cornificação, a partir da camada basal em direção a superfície (CANDI et al., 2005; FUCHS e RAGHAVAN, 2002).

Os queratinócitos representam o principal tipo celular presente na epiderme, sendo responsáveis pela manutenção da integridade da estrutura epidérmica. Os queratinócitos também estão envolvidos na resposta imunológica do tecido cutâneo, uma vez que expressam diferentes citocinas, quimiocinas e também moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC-II). No processo de diferenciação celular os queratinócitos passam a produzir a queratina, uma proteína resistente e impermeável que preenche as células mais superficiais da epiderme (corneócitos) e que promove força mecânica, mantêm a estrutura do queratinócito e contribui na adesão celular. As propriedades estruturais e funcionais dos queratinócitos presentes na epiderme de humanos e pequenos mamíferos são extraordinariamente semelhantes (CHAN, 2004).

Os melanócitos são as células produtoras de melanina que contribuem para a coloração da pele e para a proteção contra a radiação ultravioleta (UV). Os melanócitos são células arredondadas com prolongamentos dendríticos longos que se estendem

pelas duas camadas inferiores da pele (ROSS et al., 1993). Essas células estão localizadas na camada basal da epiderme (camada basal), onde formam uma unidade com os queratinócitos cuja proporção é de 1:5, que é mantida através da regulação da divisão dos melanócitos (HAAS e HERLYN, 2005; FITZPATRICK et al., 1979). Os melanócitos sintetizam a melanina na forma de melanossomas, que são transferidos para os queratinócitos das camadas superiores através da passagem dos seus prolongamentos dendríticos, cujo processo é chamado de secreção citócrina (ROSS et al., 1993). Além da pele, os melanócitos também estão presentes no epitélio de mucosas, no bulbo capilar, no sistema nervoso central, na retina e no aparelho ocular (SAMPAIO et al., 2000).

As células de langerhans estão localizadas nas camadas suprabasais da epiderme da pele e das mucosas, onde desempenham um importante papel na reposta imune cutânea (CHAN, 2004). As células de langerhans são células migratórias que possuem vários receptores de membrana envolvidos no processo imunológico (ex.: MHC classe II, IgG - imunoglobulina G, C₃ -fator do complemento C₃). Assim, essas células são responsáveis pelo reconhecimento, captação, processamento e apresentação de antígenos solúveis e haptenos aos linfócitos T. Em certas doenças inflamatórias cutâneas, como na dermatite de contato e em processos alérgicos, verifica-se que as células de langerhans se tornam mais abundantes (NORRIS, 2004; HAAKE et al., 2000).

As células de Merckel são células epidérmicas modificadas, localizadas no estrato basal (ROSS et al., 1993). No citoplasma dessas células existem grânulos que contêm catecolaminas, além disso esse tipo celular está freqüentemente próximo ou em contato com nervos não-mielinizados, onde formam sinapses com terminações nervosas periféricas (NORRIS, 2004). Assim, as células de Merckel atuam como mecanoreceptores e também contribuem no desenvolvimento do plexo nervoso na porção superior da derme (HAAKE et al., 2000).

Além das células residentes da epiderme (queratinócitos, melanócitos, células de langerhans e células de Merkel), outras células migram para a epiderme em resposta aos mais variados estímulos nas quais incluem: os linfócitos, macrófagos, neutrófilos e

eosinófilos, sendo essas células elementos da resposta de defesa inata ou adquirida (RANG et al., 2007; NORRIS, 2004).

A derme consiste num tecido conectivo, cuja espessura é superior ao da epiderme, porém com uma população celular inferior. Esta estrutura confere à pele elasticidade, força tensil e resistência mecânica. Além disso, a derme interage com a epiderme através da junção dermoepidérmica, garantindo assim as trocas de elementos nutritivos e metabólicos entre essas camadas (HAAKE et al., 2000). A derme é dividida em camada papilar, que é a camada mais próxima da epiderme, e a camada reticular, que é formada por um tecido conectivo denso e constitui a maior parte da derme (NORRIS, 2004). A constituição da derme envolve polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares), receptores sensoriais (ex.: corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos. Os fibroblastos sintetizam diferentes macromoléculas que entram na constituição da matriz celular como, por exemplo, o colágeno e a elastina (HAAKE et al., 2000; SAMPAIO et al., 2000; ROSS, 1993). Durante um processo inflamatório ou de cicatrização ocorre o aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos devido a ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1 α (IL-1 α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

Os vasos sanguíneos presentes na derme permitem que ocorra a infiltração de células migratórias importantes no processo de resposta de defesa inata ou imune e de cicatrização, como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, etc (RYAN, 2004). As inervações vegetativas presentes na derme inervam glândulas sudoríparas, músculo pilo-erector e vasos sanguíneos, auxiliando no controle da temperatura corporal. A inervação sensitiva, por sua vez, conduz a estímulos mecânicos, térmicos, químicos e dolorosos para o sistema nervoso central (GOODWIN e WHEAT, 2004).

A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda, prontamente e efetivamente, a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio

externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta, extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea (BURBACH, et al., 2000; HAAKE et al., 2000; WILLIAMS e KUPPER, 1996). A camada córnea é rompida pelas estruturas anexas (folículos pilosos e glândulas sebáceas) e as infecções nessas regiões são suprimidas pela resposta imune inata, que inclui vários elementos como os macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, bem como várias citocinas e quimiocinas. Além disso, também se verifica nas células epidérmicas a presença de receptores para agentes invasores como o CD₁₄, receptores toll-like e receptores de manose. A pele, além de ser um dos principais locais para a invasão de bactérias, fungos, parasitas e vírus, também é um importante local para a indução de tumores, porém todos esses processos são influenciados pela resposta imune adquirida, que inclui células dendríticas especializadas (ex.: células de langerhans) e linfócitos T helper (Th₁ e Th₂) (NORRIS, 2004). Nesse contexto, a pele é muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas também uma extensão do sistema imunológico (WILLIAMS e KUPPER, 1996).

1.2. Inflamação cutânea

A pele, como interface com o meio externo, tem um papel importante de proteção, termoregulação, resposta imunológica, bem como na manutenção e desenvolvimento de defesa, uma vez que está constantemente sujeita a estímulos externos, tais como patógenos, agentes mecânicos, agentes químicos e resposta auto-imune. Tais estímulos desencadeiam uma resposta imediata de proteção ao organismo, denominada resposta inflamatória, cuja finalidade é erradicar o agente agressor, de forma a evitar sua disseminação a outras regiões do organismo, promover o reparo tecidual e restabelecer a homeostasia da pele (FIRESTEIN, 2004; BECKER, 1997). A resposta inflamatória é caracterizada, a nível clínico, por quatro sinais clássicos, que incluem calor, eritema, edema e dor. Porém, uma resposta inflamatória exacerbada pode promover uma descompensação fisiológica, levando a perda de função do tecido e/ou órgão (RANG et al., 2007; SERHAN e SAVILL, 2005).

A cascata de eventos desencadeada após uma agressão ou estímulo resulta no aumento do calibre microvascular, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos, como conseqüência de uma interação complexa entre diferentes tipos celulares residentes no tecido cutâneo (queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais, macrófagos) e vários mediadores pró-inflamatórios (NICKLOFF e NESTLÉ , 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Os mediadores pró-inflamatórios liberados durante o processo inflamatório, tanto pelas células residentes do tecido cutâneo quanto pelas células transientes (neutrófilos, linfócitos, monócitos), incluem os metabólitos do ácido araquidônico (AA), histamina, serotonina, substância P, citocinas, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês, reactive oxygen species) etc (SIMMONS, 2006; KUPPER^a, 1990).

Os queratinócitos constituem as células envolvidas na primeira linha de defesa do sistema imune cutâneo devido à produção de vários mediadores pro-inflamatórios, como as citocinas, cuja produção se mostra consideravelmente aumentada após a ativação dessas células por diferentes estímulos (WILLIAMS e KUPPER, 1996). Além dos queratinócitos, outras células residentes na epiderme e derme, como fibroblastos, células endoteliais, melanócitos e macrófagos também produzem diversas citocinas mediante um estímulo (BURBACH et al, 2000; KUPPER^a, 1990).

As citocinas são mediadores protéicos cujas ações envolvem o desenvolvimento da resposta imune celular e humoral, indução da inflamação, controle da proliferação e diferenciação celular, bem como a indução da cicatrização. As citocinas regulam, de forma autócrina e parácrina, a resposta imune e inflamatória através da interação com receptores específicos presentes nos queratinócitos, fibroblastos, células de langerhans, células endoteliais e linfócitos T infiltrados, promovendo a mobilização de leucócitos a partir do sangue e a ativação de outras células do tecido cutâneo (RANG et al., 2007; UCHI et al., 2000; WILLIAMS e KUPPER, 1996).

Os queratinócitos produzem uma variedade de citocinas, incluindo as interleucinas (IL), fatores de crescimento, o fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (ex: GM-CSF) e algumas quimiocinas (UCHI et al., 2000). No entanto, entre todas as citocinas produzidas pelos queratinócitos, somente as primárias (IL-1 α , IL-1- β e TNF- α -

fator de necrose tumoral) ativam um número suficiente de mecanismos efetores capazes de desencadear uma resposta inflamatória cutânea (KUPPER^b, 1990).

A epiderme contém uma grande quantidade de IL-1 α pré-formada e ativa, além de uma quantidade significativa de IL-1 β imatura, ambas armazenadas a nível intracelular, mas frente a um estímulo ou dano celular essas citocinas são liberadas, atuando seguidamente nos seus receptores específicos, como o receptor IL-1 tipo 1 (GROVES et al., 1996; MIZUTANI et al., 1991). Contrário à IL-1 α , a produção constitutiva das outras citocinas é mínima ou até mesmo indetectável, mas a expressão, produção e liberação das citocinas para o meio extracelular pode ser induzida por uma variedade de estímulos exógenos (WILMER et al., 1994).

As citocinas primárias desempenham um importante papel na homeostasia e na modulação da resposta inata e imune da pele frente a agentes nocivos (vírus, fungos, bactérias, agentes químicos e radiação UV), considerando que estas citocinas são potentes iniciadores do processo inflamatório e de reparo com ampla atividade biológica, incluindo a ativação das células endoteliais e a indução de várias citocinas secundárias algumas delas com ação quimiotática e ativadora de leucócitos (BURBACH et al., 2000; UCHI et al., 2000; GROVES et al., 1996; WILLIAMS e KUPPER, 1996; WILMER et al., 1994).

A exposição celular as citocinas primárias (IL-1 e TNF- α) resulta na ativação de algumas vias de sinalização, como das proteínas quinases (PKC, PKA) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que culmina na estimulação da atividade de alguns fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB) e a proteína ativadora-1 (AP-1). Estes fatores de transcrição quando ativados induzem a transcrição gênica de diversas citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGF- B₁ - fator de crescimento tumoral), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios secundários óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (PASCUAL e GLASS, 2006; DELHASE, 2003; WINYARD, 2003; BARNES e KARIN, 1997). Assim, a principal função da IL-1 e do TNF- α , é desencadear a resposta inflamatória inata e atuar como uma molécula co-estimulatória da resposta imunológica (UCHI et al., 2000). Além disso, o

TNF- α também tem um papel importante no processo de remodelação do tecido após um dano, pois atua como fator angiogênico e como fator de crescimento dos fibroblastos (BURBACH et al., 2000).

Entre as citocinas secundárias convém destacar a IL-8, um potente agente quimiotático responsável pelo recrutamento de leucócitos, preferencialmente os neutrófilos. Essa quimiocina estimula o movimento dos leucócitos e regula a migração destes do sangue para a região extravascular (SCHRAMM e THORLACIUS, 2004). Assim, a IL-8 coopera com a IL-1 e TNF- α no processo de infiltração leucocitária, considerando que a IL-1 e TNF- α induzem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, o que é um prelúdio à migração leucocitária ao local lesado (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Além das citocinas, os metabólitos do AA (prostanóides) também desempenham um papel importante no processo inflamatório cutâneo. Estes mediadores possuem uma ampla ação mediada por receptores específicos presentes em células-alvo. Na pele, sabe-se que os prostanóides são produzidos abundantemente e que os seus receptores também estão expressos de forma considerável. No entanto, o papel fisiológico dos prostanóides no tecido cutâneo ainda não está totalmente esclarecido (KABASHIMA e MIYACHI, 2004).

A produção das prostaglandinas e dos leucotrienos é iniciada com a liberação do ácido araquidônico a partir dos fosfolípidios de membrana, uma reação catalisada pela fosfolipase A₂ (PLA₂). A PLA₂ é ativada em resposta a vários estímulos, tais como: ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento C5a (C5a) nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diferentes agentes (ROS - espécies reativas de oxigênio, UV-B, agentes químicos, etc) (RANG et al, 2007). O AA uma vez liberado serve de substrato para as duas isoformas da enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2), onde é convertido em prostaglandinas e tromboxanos (PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} , PGI₂, TXA₂), e também para a 5-lipoxigenase (5-LOX), sendo por essa via metabólica convertido em leucotrienos (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄). Na pele normal, a COX-1 está distribuída em toda a epiderme,

enquanto a COX-2 se localiza principalmente nos queratinócitos supra-basais, sendo essa isoforma prontamente induzida frente a um estímulo inflamatório.

A prostaglandina E₂ (PGE₂) é a principal prostaglandina presente no tecido cutâneo, onde modula vários eventos inflamatórios, como o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, contribuindo assim na formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos. No entanto, o tráfego dos linfócitos a partir do lúmen pós-capilar para o espaço intersticial já é um processo mediado em parte pelo LTB₄ (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; LEE et al., 2003). As PGE₂ e PGD₂, por sua vez, induzem a transcrição de enzimas requeridas para a síntese de uma outra classe de eicosanóides envolvidas na fase de resolução da fase inflamatória, como as lipoxinas (SERHAN e SAVILL, 2005).

Outros mediadores químicos também desempenham uma ação importante durante o processo inflamatório cutâneo como, por exemplo, a histamina. A histamina atua em muitos processos fisiológicos celulares, mas também intervêm nas reações alérgicas e na inflamação, sendo esse um dos principais motivos dos mastócitos estarem estrategicamente localizados na microvasculatura dos tecidos que estão em contato com o meio externo, como a pele, os pulmões e intestinos. A liberação da histamina ocorre pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. Após a degranulação dos mastócitos, a histamina atua em receptores específicos (receptores histaminérgicos) promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido (RANG et al, 2007; SCHARAMM e THORLACIUS, 2004; SILVA e CARVALHO, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outros mediadores químicos como a serotonina, substância P e neurocinina A também participam da regulação dos processos vasculares, contribuindo assim na resposta inflamatória (HOLZER, 1991).

A função coordenada da população celular presente na derme e epiderme permite que ocorra uma resposta rápida e efetiva frente à variedade de estímulos que ocorrem na interface entre o organismo e o meio externo (WILLIAMS e KUPPER, 1996). Assim,

num estado fisiológico normal a resposta inflamatória é benéfica, uma vez que protege o tecido contra danos, por exemplo, na defesa contra tumores e infecções. No entanto, a falha de algum dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória pode fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, perca o controle e desregule a homeostase do tecido, predispondo o mesmo a desenvolver um processo inflamatório crônico.

A instalação de um processo inflamatório crônico tem sido considerada a base de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, asma, esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença de Alzheimer, câncer e algumas doenças cutâneas como dermatites e psoríase (MUELLER, 2006; DEBENEDICTIS et al. 2001; ROBERT e KUPPER, 1999). Desta forma, é necessária a manutenção do equilíbrio entre os efeitos benéficos da inflamação e o seu potencial de persistência que, a longo prazo, pode ser deletério por promover a destruição tecidual (SIMMONS, 2006).

1.3. Doenças inflamatórias cutâneas e tratamento farmacológico

As doenças dermatológicas que tem em sua etiologia componentes inflamatórios e/ou imunológicos, nas quais incluem as dermatites, eczemas e psoríase, caracterizam-se por alterações cutâneas que conferem um aspecto desagradável à pele e que necessitam de tratamento prolongado, além de envolver componentes emocionais, nos quais promovem recidivas ou exacerbação das lesões (SOARES, 1995). As doenças inflamatórias da pele como dermatites e psoríase afetam vários indivíduos no mundo e a prevalência dessas doenças tem duplicada nos últimos 10 a 15 anos (RUSSELL-JONES et al, 2005; LJUBOJEVIE et al, 2002). Os mecanismos envolvidos na patogênese das doenças inflamatórias cutâneas podem ser distintos, sendo algumas doenças iniciadas por um processo alérgico ou irritativo. Assim, as doenças inflamatórias cutâneas não envolvem necessariamente o mesmo perfil e, conseqüentemente o mesmo tipo de tratamento (FIRESTEIN, 2004; LEUNG et al., 2004).

A dermatite atópica é uma doença inflamatória crônica que tem seu início antes dos 5 anos de idade em 80% dos casos e que pode persistir até a fase adulta. Caracteriza-

se por um estado de hiper-reatividade cutânea a estímulos normalmente inócuos a indivíduos não-atópicos, ressecamento intenso (xerose), prurido, eritema, níveis elevados de IgE e eosinofilia. A etiologia da dermatite atópica é bastante complexa, porém vários estudos indicam que nessa condição cutânea está envolvida a ativação de diferentes vias imunológicas e inflamatórias. A dermatite atópica é inicialmente caracterizada por níveis elevados de IL-4 e IL-13, em consequência da presença de um infiltrado de células Th₂. Essas citocinas induzem a síntese de IgE e IL-5, e esta, por sua vez, tem uma importante função no desenvolvimento e sobrevivência dos eosinófilos. No entanto, durante a fase crônica ocorre uma inversão do perfil de citocinas para o tipo Th₁, associada ao aumento da expressão de IFN- γ (interferon) (GUTTMAN-YASSKY et al., 2007; LEUNG et al., 2004).

Outra doença inflamatória crônica é a psoríase, na qual afeta aproximadamente 2 a 3% da população mundial e apresenta caracteristicamente remissão e exacerbação espontâneas. A psoríase pode iniciar em qualquer idade, porém estudos epidemiológicos revelam que o seu início é mais comum entre os 15 e 25 anos. Atualmente, a psoríase é reconhecida como uma doença auto-imune causada por uma ativação inapropriada do sistema imune celular, sendo caracterizada como uma doença papulo-escamosa, como consequência da hiperproliferação excessiva dos queratinócitos e da formação de um foco inflamatório. A sua patogenia envolve a integração de leucócitos infiltrados no tecido cutâneo (células T, neutrófilos e mastócitos), células residentes e uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e eicosanóides (KRUEGER e BAWCOCK, 2006; NICKOLOFF e NESTLE, 2004).

A dermatite de contato, por sua vez, é uma dermatose inflamatória freqüente nos países industrializados, sendo uma das doenças ocupacionais mais comuns. É caracterizada por eritema, pápulas e vesículas, seguidas de ressecamento e descamação. De acordo com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, podem-se distinguir dois tipos de dermatite de contato: a dermatite de contato irritativa, decorrente dos efeitos tóxicos e pró-inflamatórios de xenobióticos capazes de ativar a imunidade inata da pele; e a dermatite de contato alérgica, também conhecida como

hipersensibilidade de contato, que requer a ativação da imunidade adquirida antígeno-específica, levando ao desenvolvimento de células T efectoras, que são mediadoras da inflamação cutânea (HENNINO et al., 2005).

Embora haja uma sucessão previsível dos fenômenos envolvidos na resposta inflamatória, existem modificações no padrão de resposta que depende diretamente da natureza do agente agressor, dos componentes de reconhecimento do sistema imune, da produção de mediadores, do tipo de células infiltradas no sítio da inflamação e do tempo de permanência dessa resposta (RANG et al., 2007; SILVA e CARVALHO, 2004). Várias são as vias e cascatas envolvidas no processo inflamatório presente nas doenças inflamatórias cutâneas, assim existe uma variedade de alvos moleculares que, quando antagonizados ou neutralizados, bloqueiam uma via ou cascata, conduzindo a um efeito antiinflamatório e/ou imunossupressor (SIMMONS, 2006). Nesse contexto, a compreensão da ação e do uso de fármacos antiinflamatórios e imunossupressores nas doenças inflamatórias cutâneas exigem o conhecimento do tipo de reação inflamatória presente.

A melhor compreensão da imunologia cutânea permitiu grandes avanços em relação ao desenvolvimento de novas terapias na última década e aumentou o arsenal de agentes disponíveis para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas tanto na forma de monoterapia quanto na forma de um esquema terapêutico que inclui diferentes agentes utilizados simultaneamente (SKINNER, 2005).

Os agentes imunossupressores são utilizados no tratamento de afecções cutâneas que tenham em sua patogênese o envolvimento do sistema imune e exercem seus efeitos via inibição da produção ou ação da IL-2 (ex.: tacrolimus, pimecrolimus, ciclosporina), inibição da expressão de genes de citocinas (ex.: glicocorticóides) e inibição da síntese de purinas ou pirimidinas (ex.: micofenolato de mofetila) (RANG et al, 2007). Os imunomoduladores macrolactâmicos, como o pimecrolimus e o tacrolimus, inibem seletivamente a ativação das células T e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, (IL-3, IL-4, IL-5 e IFN- γ – interferon). A terapia tópica com esses agentes imunomoduladores já se mostrou efetiva em diversas condições dermatológicas, como na dermatite atópica, dermatite de contato, dermatite seborreica, etc (SKINNER, 2005).

Os glicocorticóides restringem a proliferação clonal das células Th através da redução da transcrição gênica para IL-2, porém também interferem na transcrição de outras citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1, etc). O micofenolato de mofetila tem sido cada vez mais utilizado no tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes na dermatologia, sendo útil como agente poupador do uso de glicocorticóides em certas condições dermatológicas como distúrbios bolhosos auto-imunes, incluindo o pênfigo vulgar. Também é eficaz no tratamento de doenças inflamatórias como a psoríase, dermatite atópica e piodermia gangrenosa (FOX et al, 2006).

Os fármacos anticitocinas representam um dos maiores avanços no tratamento de doenças inflamatórias crônicas graves nos últimos anos (RANG et al., 2007). Esses fármacos tem como alvo moléculas de superfície das células T (ex.: Efalizumab e Alefacept) ou bloqueiam a ação de citocinas, como por exemplo agentes anti-TNF α (Etanercept), sendo efetivos no tratamento da psoríase e da dermatite de contato, com o uso já aprovado pelo FDA. No entanto, esses fármacos são anticorpos frutos da engenharia recombinante, assim o seu custo é elevado, o que limita seu uso (TAN et al., 2007; SIMMONS, 2006; WERTH, 2006).

O sistema imune como alvo no tratamento de algumas condições dermatológicas e a compreensão do mecanismo de ação destes agentes permite a transição da terapia clássica com os glicocorticóides tópicos para a terapia com agentes imunomoduladores (SKINNER, 2005; NICKOLOFF e NESTLE, 2004). No entanto, os glicocorticóides ainda são os agentes antiinflamatórios mais empregados no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, devido aos seus efeitos sobre a resposta imune e sua ação antiinflamatória. Porém, o uso contínuo dos glicocorticóides é freqüentemente acompanhado de efeitos adversos severos e muitas vezes irreversíveis, incluindo a atrofia cutânea, telangiectasias, hipertricose, alterações no processo de cicatrização, Síndrome de Cushing, entre outros (SCHOEPE et al., 2006; SCHÄCKE et al., 2002).

Mesmo com o arsenal de agentes antiinflamatórios e imunossupressores disponíveis, alguns fatores comprometem a adesão do paciente ao tratamento como o esquema posológico, efeitos adversos indesejáveis, custo elevado do tratamento, etc (GOTTLIEB, 2005; LEUNG et al. 2004). Além disso, alguns medicamentos não atingem

a eficácia desejada ou comprometem a resposta imunológica, aumentando o risco a infecções e a emergência de linhagens celulares malignas (RANG et al., 2007; FOX et al., 2006; DISEPIO et al., 1999). Assim, tanto a academia quanto a indústria farmacêutica tem voltado sua atenção aos produtos naturais, na busca de um fármaco efetivo no tratamento das doenças inflamatórias cutâneas e com efeitos adversos reduzidos.

1.4. Plantas medicinais como alvo de novos antiinflamatórios tópicos

A utilização das plantas na medicina tradicional é tão antiga quanto a própria humanidade. Tradicionalmente o uso de plantas e a forma na qual são utilizadas em uma doença é transferida oralmente de geração em geração em uma comunidade. É admirável que este conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios sem nunca, porém, cair no esquecimento (SAMUELSSON, 2004; SILVA e CARVALHO, 2004). Assim, uma estratégia útil no desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais é, justamente, utilizar o vasto conhecimento popular em relação ao uso de plantas e produtos de origem animal em diversas enfermidades, pois este tipo de informação permite guiar a química de produtos naturais na busca de novos agentes terapêuticos. Muitos dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado que são derivados de produtos naturais provêm desta informação, definida como informação etnobotânica ou etnofarmacológica (CLARK, 2002).

Os produtos naturais tem sido a maior fonte de fármacos por séculos, como demonstrado com o isolamento da morfina a partir do ópio no início do século XIX e o isolamento de outros fármacos que se seguiram como a cocaína, codeína, digitoxina e quinina (BUTLER, 2004; NEWMAN et al., 2000). Estima-se que atualmente 25% a 30% dos medicamentos utilizados derivam de produtos naturais (CALIXTO, 2005; GREENWALDG, 1998).

Segundo Henkel et al. (1999), dos 30.000 bioativos de origem natural, atualmente conhecidos, 35% são provenientes de bactérias, 27% de plantas medicinais, 26% de fungos e 13% de animais. A diversidade molecular encontrada nos produtos naturais é

a principal razão que tem motivado várias corporações farmacêuticas a direcionarem seus estudos na busca de protótipos que possuam atividades inibitórias ou antagonistas em alvos biológicos bem definidos (TURNER, 1998; BORRIS, 1996). A transição da busca de novos fármacos pela busca de um “lead compound” ou protótipo tornou-se possível através do avanço da química orgânica e da química medicinal. Nesse contexto, a importância da investigação de plantas medicinais reside principalmente na identificação de protótipos, cuja atividade farmacológica permita o desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, ainda existe um grande desafio dentro da química medicinal que é tornar um protótipo num fármaco apropriado para o uso terapêutico (BORRIS, 1996).

As substâncias biologicamente ativas presentes nas plantas são chamadas de metabólitos secundários e são produzidas através de rotas biossintéticas diversas cujos compostos de partida são os metabólitos primários, nos quais incluem os carboidratos, proteínas e lipídeos, que são essenciais para as funções vitais da planta (POSER e MENTZ, 2004). Os metabólitos secundários são substâncias de baixo peso molecular, de estrutura complexa, marcante atividade biológica e, contrariamente aos metabólitos primários, são encontrados em concentrações relativamente baixas e somente em determinados grupos de plantas (POSER e MENTZ, 2004; ALVES, 2001).

Atualmente são conhecidos 140.000 metabólitos secundários que apresentam diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais. De acordo com a estrutura e/ou origem biogênica, os metabólitos secundários podem ser divididos em diferentes grupos, tais como: esteróides, alcalóides, flavonóides, terpenos, taninos, cumarinas, lignanas, etc (STROHL, 2000; VERPOORTE, 2000; PHILLIPSON, 1999). Assim sendo, o reino vegetal representa um forte manancial para a investigação de novas moléculas e terapias, considerando que dentre as 250.000 espécies conhecidas somente uma pequena porcentagem (8 a 12%) foi investigada sob o ponto de vista químico e, ainda, uma menor fração foi submetida a ensaios de atividade biológica (WILLIAMSON et al., 1996).

Os metabólitos secundários, como moléculas biologicamente ativas, podem interferir em vários mecanismos ou mediadores envolvidos no processo inflamatório,

tais como: metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, enzimas (NOS, COX-2, fosfolipase A₂), produção de segundos mensageiros (proteína-quinase, cGMP, cAMP), fatores de transcrição (NF-κB, AP-1), etc (CALIXTO, 2003). Assim, a considerável diversidade e complexidade das estruturas químicas e a atividade biológica encontrada nos metabólitos secundários, predispõem a identificação de protótipos com atividade interessante antiinflamatória interessante. Nesse contexto, o interesse pelas plantas medicinais permanece forte, pois permite o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de diversas doenças, inclusive aquelas que acometem a pele, considerando que os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento de várias dermatoses (psoríase, dermatite atópica, eczemas, etc), como os antiinflamatórios não-esteroidais, anti-histamínicos, glicocorticóides e imunossupressores, muitas vezes não apresentam a eficácia desejada, além de promoverem efeitos adversos que limitam seu uso (FIRESTEIN, 2004; CLARK, 2002).

O tratamento com plantas medicinais tornou-se extremamente popular. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 88% da população faz uso de plantas medicinais como tratamento primário de diversas doenças, de forma que 6 a 8% das pessoas as utilizam com a finalidade de tratar patologias relacionadas com a pele (ERNST, 2000; WHO, 2002). Além disso, 30% dos produtos provenientes da medicina tradicional têm são utilizados no tratamento de diferentes condições dermatológicas (SOSA et al, 2002; CAUWENBERGH, 2002).

Plantas que são utilizadas tradicionalmente na cicatrização, febre, infecção, edema ou doenças reumáticas, são indicadores da presença de compostos com propriedades antiinflamatórias e, assim, devem ser investigadas e a sua eficácia comprovada. A evolução no entendimento dos aspectos moleculares da patofisiologia da inflamação favoreceu o estabelecimento de novos sistemas de testes *in vitro* para a seleção de diversas substâncias que permitem a identificação de novos compostos antiinflamatórios (CARVALHO, 2004). Existem vários ensaios *in vitro* que são utilizados para testar a atividade antiinflamatória, porém o procedimento de triagem mais comum é a verificação da inibição da COX e/ou da 5-LOX. Extratos ou compostos isolados de várias plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram promover a inibição da

COX e/ou 5-LOX, como a *Achillea millefolium*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea*, *Hamamelis virginiana*, *Juniperus communis*, *Ledum palustre*, *Polygonum aviculare*, *Sanguinaria canadensis* e *Tanacetum vulgare* (BORCHERS et al., 2000). Outras plantas revertem o processo inflamatório por atuarem em outros alvos como, por exemplo, a *Glycyrrhiza glabra* que, além de inibir a atividade da COX, também promove a inibição da atividade da enzima PLA₂, exibindo uma atividade comparável à hidrocortisona. Além disso, a *Glycyrrhiza glabra* também inibe a formação de ROS pelos neutrófilos no sítio inflamado (AKAMATSU et al., 1991; OKIMASU et al, 1983; OHUCHI e TSURUFUJI, 1982). A *Arnica montana*, por sua vez, inibe um alvo central do processo inflamatório: o fator de transcrição NF-κB, que resulta na supressão da transcrição gênica de alguns mediadores pró-inflamatórios (MERFORT, 2003).

Muitas plantas que apresentam atividade antiinflamatória já tiveram os compostos responsáveis por tal atividade isolados e caracterizados, como por exemplo, os terpenos presentes na *Matricaria recutita* (os monoterpenos α-bisabolol e azuleno), na *Calêndula officinalis* (os triterpenos taraxasterol e o lupeol), na *Arnica montana* (a lactona sesquiterpênica helenalina), na *Glycyrrhiza glabra* (o triterpeno glicirrizina ou ácido glicirrízico), no *Rosmarinus officinalis* (os triterpenos ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido micromérico), *Salvia officinalis* (o triterpeno ácido ursólico), na *Cordia verbenaceae* (o sesquiterpeno α-humuleno), etc (ALTINIER et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; BLUMENTHAL, 2003; AKAMATSU et al., 1991; OKIMASU et al, 1983).

Cerca de 300 preparações de plantas medicinais destinadas ao tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, tiveram sua eficácia comprovada e seu uso tradicional validado pela entidade reguladora de medicamentos da Alemanha (Comissão E), nas quais estão incluídas a *Arnica montana*, *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita*, *Echinacea sp.*, *Sanguinária canadenses*, *Hammamelis virginiana*, *Aveno sativa*, *Aloe Vera* e *Hypericum perforatum* (MEYER et al, 2005; DATNER, 2003; BEDI e SHENEFELT, 2002). No entanto, grande parte das plantas utilizadas na medicina tradicional ainda não foi submetida a estudos que comprovem sua eficácia e segurança e o uso popular não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros. Afinal, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico

sintético e a preconização ou autorização oficial do seu uso como medicamento, devem estar fundamentadas em evidências experimentais (SIMÕES et al., 2000).

1.5. *Vernonia scorpioides*

1.5.1. Aspectos botânicos e Etnofarmacológicos

A espécie *Vernonia scorpioides* (Lam.) Persons, pertence à família Asteraceae que reúne cerca de 1100 gêneros com aproximadamente 2500 espécies de ampla distribuição, sendo a família com o maior número de espécies entre as dicotiledôneas. Além disso, as espécies da família Asteraceae apresentam inúmeras propriedades farmacológicas devido a variedade dos metabólitos secundários presentes como, por exemplo, os terpenos, flavonóides, poliacetilenos e as lactonas sesquiterpênicas (FREIRE et al., 1996; LOPES, 1991; DAVINO, 1989; CUNHA, 1989). A família Asteraceae é composta por 13 tribos, na qual se destaca a tribo *Vernoniae* com cerca de 70 gêneros e 1500 espécies. No Brasil, existem 40 gêneros e entre eles está presente o gênero *Vernonia* (CUNHA, 1989). As espécies do gênero *Vernonia* são utilizadas na medicina popular, principalmente na África, América central e América do Sul e tem sido objeto de vários estudos em relação a sua atividade antiinflamatória, antipirética, antitumoral e antimalárica (GUPTA et al., 2003; MAZUMDER et al., 2003; IWALEWA et al., 2003; LAMBERTINI et al., 2004; MUREGI et al., 2003).

No Brasil, são estimadas 200 espécies do gênero *Vernonia*, onde várias destas são utilizadas na medicina popular, incluindo a *Vernonia scorpioides* (figura 3), sendo esta uma erva comum da vegetação secundária da encosta atlântica e da floresta latifoliada do alto do Uruguai, no extremo oeste catarinense. Porém, apresenta uma extensa distribuição geográfica, sendo encontrada desde o Ceará até o Rio Grande do Sul, como também no centro-oeste (CORREA, 1984; CABRERA, 1980).

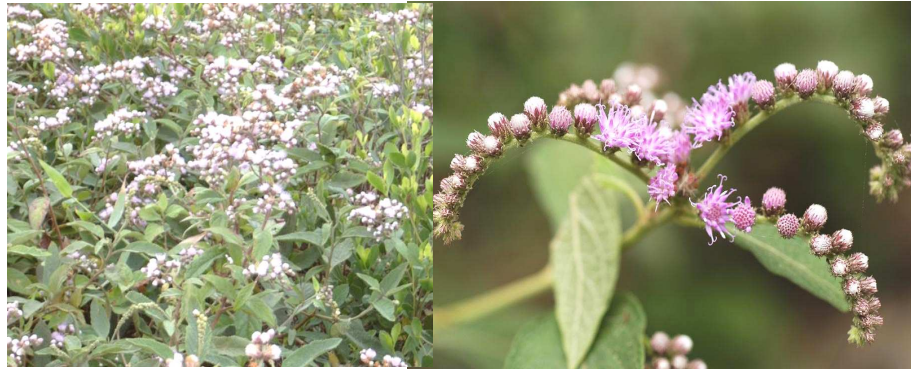


Figura 3: *Vernonia scorpioides* Lam. (Asteracea). **Fonte:** Buskühl, 2007.

Em relação à descrição botânica, a *Vernonia scorpioides* é uma espécie perene, subarbustiva, bastante ramificada, com caule lanuginoso-pubescente, medindo entre 1 a 2 metros de altura. As folhas são alternadas, membranáceas, glabras na face superior e cerício-pilosa na inferior, pecioladas, medindo 6 a 12 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura. As inflorescências são terminais, em cimeiras escorpióides de capítulos sésseis. As flores são violáceas em número de 20 a 30 por capítulo (figura 4) (LORENZI, 1982).

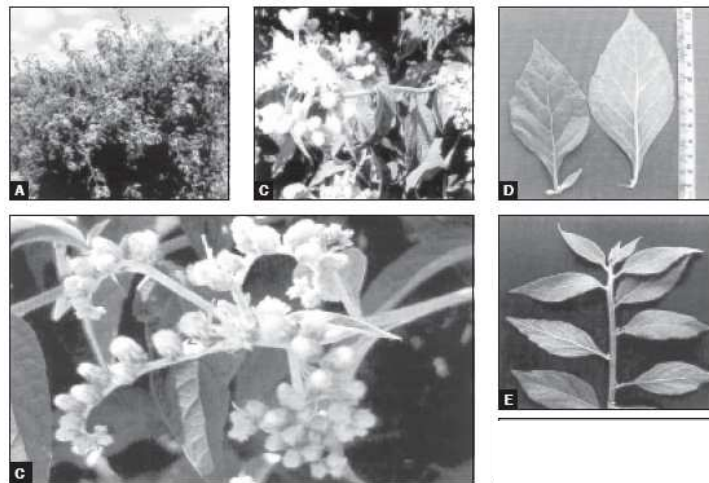


Figura 4: *Vernonia scorpioides* Lam. (Asteracea). A - Vegetal florido, B – Inflorescência característica, C – folhas, D – Ramo não florido. **Fonte:** Adaptado de Toigo, 2007.

A *V. scorpioides* é popularmente conhecida como assa-peixe, piracá, enxuga, erva-de-são-simão, erva-de-preá, capichingui, capichingui-de-bicho e noqueira. Tradicionalmente é utilizada por via tópica no tratamento de várias desordens cutâneas, incluindo úlceras crônicas, alergias, irritações, prurido, edemas provocados por traumatismos ou infecção, nevralgia, processos inflamatórios e lesões cutâneas em geral (CABREIRA,1980; MORAES, 1997). Além disso, nos levantamentos etnobotânicos também foi constatado a utilização da *V. scorpioides* em úlceras gástricas (chás), como sedativo (chás), hemorróidas e leucorréia (banho das partes afetadas), sendo as folhas a parte do vegetal preferencialmente empregada na medicina tradicional (DREUX, 2005).

1.5.2. Descrição fitoquímica

Vários compostos foram isolados a partir do gênero *Vernonia*, tais como flavonóides, esteróides e polissacarídeos (NERGARD et al., 2004; HUANG et al, 2003; TCHINDA et al., 2003). A composição química da *V. scorpioides* ainda não está bem descrita, porém foi verificado que as partes aéreas da planta possuem um óleo essencial cuja composição inclui germacreno D, transcariofileno, limoneno, Δ -cardineno, biciclogermacreno, β -pineno, β -mirceno, α -copaeno, α -humuleno e aloaromadendreno (TOIGO et al., 2004). Também foram isolados alguns compostos característicos do gênero *Vernonia*, como as lactonas sesquiterpênicas (LS), destacando-se entre elas o escorpiolídeo, escorpioidina e um novo guaianolídeo (GOMES et al., 1987; WARNING et al., 1987; DREW et al., 1980). Buskühl (2007) isolou e caracterizou o cafeato de etila, um poliacetileno inédito na literatura (5-octa-2,4,6-triiril-5H-furan-2-ona) e uma mistura de lactonas sequiterpênicas, na qual inclui alguns hirsutinolídeos e um glaucolídeo a partir do extrato das partes aéreas (figura 5), durante o processo de isolamento destes compostos também foi identificada a presença de alguns flavonóides, a luteolina e a apigenina.

As LS são descritas como os constituintes ativos das plantas medicinais da família Asteraceae, usadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças

inflamatórias. As atividades biológicas atribuídas às LS, conforme demonstrado em diferentes estudos, englobam ação antiinflamatória, anti-helmíntica, fungicida e citotóxica, além de promover um efeito relaxante sobre o músculo liso (CAMPOS et al., 2003; KRISHINA-KUMARI et al, 2003; KUO et al, 2003;). Assim, as LS não são somente marcadores taxonômicos interessantes do gênero *Vernonia*, como também merecem considerável atenção devido à sua atividade antiinflamatória, conforme demonstrado em diferentes modelos de inflamação (HALL et al., 1979; SIEDLE et al., 2004).

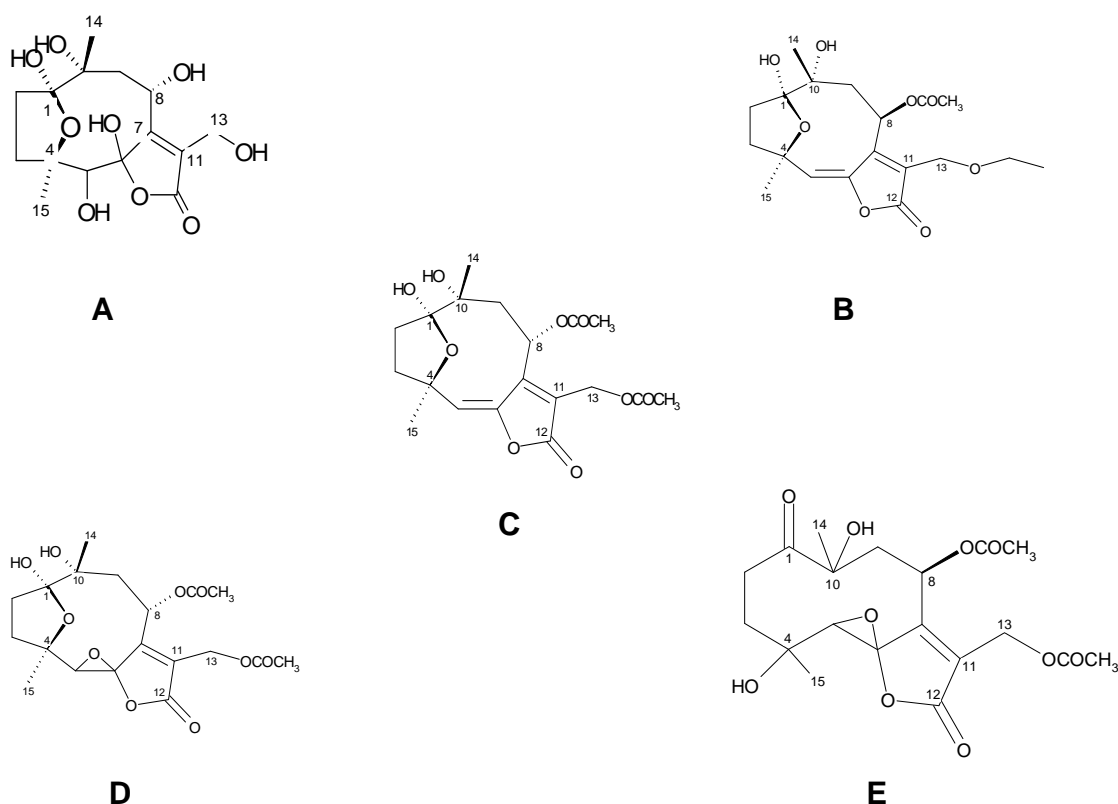


Figura 5: Compostos isolados e caracterizados a partir das folhas e inflorescências da *Vernonia scorpioides*. Hirsutinólídeos (A, B, C, D) e Glaucólídeo (E). **Fonte:** Buskühl, 2007.

As LS modulam muitos processos inflamatórios, como a liberação de histamina pelos mastócitos e de serotonina pelas plaquetas, a exocitose da elastase pelos

neutrófilos humanos, a inibição da 5-LOX e a leucotrieno C₄ sintetase, diminuição da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) e a proliferação de linfócitos, como demonstrado, por exemplo, pelas LS da classe dos hirsutinólídeos isoladas da *Vernonia triflosculosa* (figura 6). Assim, sugerindo que o efeito supressor das LS envolve o fator de transcrição NF- κ B (KOS et al., 2006; SIEDLE et al., 2003; KOCH et al., 2001; HALL et al, 1980; HALL et al., 1979).

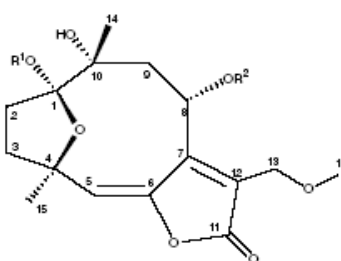


Figura 6: Hirsutinólídeos isolados da *Vernonia triflosculosa* (1 R₁=CH₃; R₂=4-OH-metacrilóil; 2 R₁=H; R₂=4-OH-metacrilóil). **Fonte:** Adaptado de Kos et al., 2006.

Os flavonóides são compostos fenólicos que estão presentes nas espécies do gênero *Vernonia*, inclusive na espécie *V. scorpioides* onde foi identificada a presença dos flavonóides luteolina e apigenina (BUSKÜHL, 2007; HUANG, 2003). Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é vasto e, na maioria dos casos, empírico.

Algumas propriedades farmacológicas já foram atribuídas aos flavonóides, entre as quais se destacam as atividades antioxidante, antiviral, antiinflamatória, anti-alérgica, antitumoral, hormonal e atividade sobre a permeabilidade capilar (ZUANAZZI e MONTANHA et al, 2004; KIMATA et al, 2000). De acordo com alguns estudos, a atividade antiinflamatória dos flavonóides ocorre via modulação de enzimas relacionadas com o metabolismo do AA, como a PLA₂, COX e/ou LOX, bem como a inibição do fator de transcrição nuclear NF- κ B, dependendo da estrutura do composto (YANAMOTO e GAYNOR, 2001; PARK et al., 2001), justificando assim o uso

tradicional de muitos extratos de plantas como antiinflamatórios, cujos constituintes fitoquímicos presentes são os flavonóides (PARK et al., 2001).

1.5.4. Estudos farmacológicos com a *Vernonia scorpioides*

Os primeiros estudos realizados com a *V. scorpioides* demonstraram a atividade fungicida e uma moderada atividade bactericida do extrato bruto das folhas e das frações hexano e clorofórmio (CAMPOS, 2001; FREIRE et al., 1996). Posteriormente, Leite et al. (2002) investigaram a ação cicatrizante do extrato etanólico das folhas da *V. scorpioides* e demonstraram que o tratamento com o extrato não acelerou o tempo de fechamento da ferida, mas contribuiu no processo de regeneração e organização tecidual da lesão.

Estudos mais recentes revelaram propriedades antiinflamatórias e anti-tumorais da *V. scorpioides*, onde Dreux (2005) demonstrou que o extrato hidroalcolico, administrado por via intraperitoneal, promoveu a inibição de processos inflamatórios agudos em modelos de edema de pata induzido por carragenina e histamina. A administração oral desse extrato também diminuiu a migração de neutrófilos e leucócitos mononucleares em modelo de peritonite induzida por carragenina, sendo este resultado confirmado em análise histológica de amostras teciduais provenientes do modelo de edema de pata induzido por carragenina. Pagno et al. (2006), por sua vez, investigaram o efeito da fração diclorometano sobre o tumor ascítico de Erlich, em camundongos, e demonstraram a atividade anti-tumoral e citotóxica dessa fração. Da mesma forma, algumas lactonas sesquiterpênicas isoladas a partir da fração diclorometano, como hirsutinolídeos e glaucolídeo, apresentaram atividade citotóxica *in vitro* sobre algumas linhagens celulares (Hela, L929, B16F10), sendo essa ação decorrente tanto do processo de necrose quanto de apoptose (BUSKÜHL, 2007).

Apesar da *V. scorpioides* ter sido submetida a alguns estudos farmacológicos, nenhum estudo que comprove a atividade antiinflamatória tópica dessa planta e justifique o seu uso pela população no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, foi realizado até o presente momento.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antiinflamatório tópico do extrato etanólico da *V. scorpioides* (EEVS) e de algumas frações, além do composto isolado luteolina, em modelos de inflamação cutânea aguda e crônica em camundongos, bem como investigar os possíveis mecanismos envolvidos com a atividade antiinflamatória dessa planta, através de técnicas farmacológicas e bioquímicas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antiinflamatório do EEVS e de diferentes frações, bem como do composto isolado luteolina, em modelo de edema de orelha mediado por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) em camundongos;
- Avaliar a atividade antioxidante do EEVS no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA;
- Avaliar o efeito antiinflamatório do EEVS em modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (AA), capsaicina, fenol e histamina em camundongos;
- Avaliar o efeito antiinflamatório do EEVS em processos de hipersensibilidade cutânea mediado pela aplicação tópica da oxazolona em camundongos;
- Avaliar o efeito antiinflamatório do EEVS em processos inflamatórios cutâneos crônicos, através do modelo de edema de orelha mediado pela aplicação múltipla do óleo de cróton em camundongos;
- Avaliar a migração celular em tecido cutâneo no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação de TPA, oxazolona e aplicação múltipla de óleo de

cróton em camundongos tratados com o EEVS e com a fração DCM da *V. scorpioides*;

- Avaliar os parâmetros de inflamação (hiperproliferação celular, edema e infiltração leucocitária) através da análise histológica das orelhas obtidas nos modelos de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA e pela aplicação múltipla de óleo de cróton.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. EXTRATO E FRAÇÕES DA *Vernonia scorpioides*

O extrato etanólico da *V. scorpioides* (EEVS), as diferentes frações (hexano, diclorometano, acetato e acetato enriquecido) e o composto isolado luteolina foram fornecidos pela Prof. Dra Maique Biavatti do departamento de fitoquímica da Universidade do Vale do Itajaí (Itajaí, SC). As partes aéreas (folhas e flores) da *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) foram coletadas em Novembro de 2005, em Navegantes (SC), e a identificação foi realizada pela Dra Ana Claudia Araújo (Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina). O *voucher* foi depositado no Herbário Barbosa Rodrigues [M. Biavatti 11 (15/03/01)], em Itajaí (SC).

As folhas e flores da planta foram macerados em etanol bidestilado por 7 dias, na ausência de luz, e o extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor até evaporação do álcool, utilizando para tal um Rotavapor a vácuo (Quimis, São Paulo). Posteriormente, foi realizado o fracionamento fitoquímico do extrato bruto etanólico em 1/3 de água através da partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e acetato de etila), originando assim as frações hexano, diclorometano e acetato, respectivamente. A fração acetato enriquecido foi obtida a partir da junção de uma sub-fração da fração diclorometano (DCM) com uma sub-fração da fração acetato de etila, da qual foi isolado o composto luteolina. Todos os compostos foram armazenados sob temperatura de 4°C em potes d essecadores.

3.2. ANIMAIS E MANUTENÇÃO

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas e machos (25-35g) do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFPR, mantidos em condições de temperatura controlada (22±2 °C), respeitando uma fase clara/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial (Nuvital). Antes

do início dos experimentos os animais foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 1 hora para adaptação, não sendo estes animais reutilizados em testes posteriores. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEEA da Universidade Federal do Paraná sob o número 127 e os experimentos conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios (CEEA, 2003).

DROGAS E REAGENTES

As drogas e reagentes utilizados foram: 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), ácido araquidônico, capsaicina, dihidrocloridrato de histamina, óleo de cróton, oxazolona, indometacina, Tetrametilbenzidina (TMB), 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DSFA-DA), hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma Chemical Co, EUA), fenol (Merck Biosciences, Germany), ácido alfa-lipóico (Galena), anti-mouse CD45/FITC; anti-mouse CD4/PE, anti-mouse CD8/PE (BD Pharmigen), dimetilformamida, acetona, formaldeído, ácido acético glacial, fosfato de sódio (Na_2HPO_4) (Merck Biosciences, Germany), peróxido de hidrogênio, álcool absoluto, eosina, hematoxilina, floxina B, xilol, tween 80 (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

O extrato etanólico da *Vernonia scorpioides* (EEVS) e o composto isolado luteolina, quando administrados topicamente, foram pré-solubilizados em 3% de Tween 80 e 30% de etanol, sendo posteriormente diluído em 77% do volume final de acetona. As frações da *V. scorpioides*, a dexametasona, a indometacina, bem como os agentes flogísticos (TPA, ácido araquidônico, capsaicina, fenol, óleo de cróton e oxazolona) foram diretamente solubilizados em acetona grau P.A., com exceção da histamina que foi solubilizada em salina em decorrência da via na qual esta foi administrada. Em relação à administração oral do EEVS, este foi pré-solubilizado em 3% de tween 80, sendo posteriormente diluído em salina.

3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS (MODELO DE EDEMA DE ORELHA)

3.4.1. Avaliação do edema de orelha

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos (μm), de acordo com a metodologia revisada por Hecker e Schmidt (1974). A espessura da orelha foi medida próxima à extremidade medial da mesma, com o auxílio de um micrômetro digital (GREAT MT – 045B), antes e após determinado tempo da indução do processo inflamatório, dependendo do agente flogístico utilizado. O EEVS, as frações (hexano, DCM, acetato e acetato enriquecido), o composto isolado luteolina e os agentes flogísticos foram dissolvidos em 20 μL de acetona e aplicados na orelha direita de camundongos. Para minimizar variações concernentes à técnica, os experimentos foram conduzidos sempre por um único experimentador.

3.4.2. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA

O TPA é um éster de forbol presente no óleo de cróton (*Croton tiglium* L.), sendo um potente agente flogístico e promotor de tumor capaz de promover uma resposta inflamatória e hiperproliferativa bastante intensa, assemelhando-se com algumas doenças cutâneas (GÁBOR, 2003; GÁBOR, 2000). Esse modelo de inflamação cutânea aguda permite identificar inibidores da biossíntese das PG e LT, assim é amplamente utilizado na triagem de compostos que pertencem à classe dos inibidores da COX e/ou LOX, bem como compostos com atividade corticóide-*like* (GÁBOR, 2000).

Para avaliar a atividade do EEVS nesse modelo, o edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 μg /orelha de TPA, dissolvido em 20 μL de acetona. O EEVS (0,003 a 1 mg/orelha), as frações (0,003-0,6 mg/orelha) da *V. scorpioides*, bem como os controles positivos dexametasona (0,05 mg/orelha) e indometacina (2 mg/orelha), foram aplicados topicamente logo após o tratamento com o TPA. A espessura da orelha foi avaliada 6 horas após a aplicação do TPA (DE YOUNG et al,

1989), conforme descrito no item 3.4.1. Amostras das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm de tecido) foram coletadas 24 horas após a aplicação do TPA e submetidas a análise histológica, a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e a quantificação de espécies reativas.

Para avaliar o efeito antiedematogênico do EEVS administrado por outra via (sistêmica) no modelo de edema orelha induzido por TPA, os animais foram tratados por via oral, 1 h antes da aplicação do TPA, com 1000 mg/kg do extrato dissolvido em salina. A avaliação do edema foi realizada como descrito anteriormente.

3.4.3. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico.

O ácido araquidônico quando aplicado topicamente é metabolizado em vários mediadores que promovem a formação do edema, como a PGE₂, LTC₄ e LTD₄, como consequência do processo inflamatório instalado (HUMES et al., 1986). Assim, compostos que inibem o metabolismo do ácido araquidônico em prostaglandinas e leucotrienos são identificados neste modelo. Para avaliação da ação do EEVS sobre o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico, este foi diluído em acetona, de forma a atingir uma concentração de 2 mg/20 µL, sendo posteriormente administrado por via tópica na orelha direita dos camundongos. Em seguida, o EEVS (0,03 a 1 mg/orelha) e o controle positivo indometacina (2 mg/orelha), também dissolvidos em 20 µL de acetona, foram aplicados topicamente. O edema foi avaliado 1 hora após o desafio com o agente flogístico, conforme descrito no item 3.4.1. (YOUNG et al., 1984; CRUMMEY et al., 1987).

3.4.4. E Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do fenol

O modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica do fenol consiste num modelo animal de inflamação cutânea causada por um agente irritante que se assemelha à dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM et al., 2004). A ação da EEVS sobre a resposta inflamatória mediada por um agente irritante foi avaliada

através da aplicação tópica do fenol na orelha de camundongos. A solução de fenol a 10% (v/v) foi dissolvida em acetona (20 μ L) e aplicada na orelha direita dos camundongos, seguida da aplicação tópica de 20 μ L do EEVS (1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha), diluídos em acetona. Neste modelo, o edema na orelha dos animais alcança uma intensidade máxima 1 hora após a aplicação do fenol, assim o aumento da espessura da orelha foi avaliado 1 hora após o desafio com este agente irritante, conforme procedimento descrito no item 3.4.1. (GÁBOR, 2000).

3.4.5. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica da capsaicina

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenemida), quando aplicada topicamente, induz a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios que promovem vasodilatação e eritema como resposta imediata, seguido da formação de edema cujo pico máximo é atingido até 30 minutos após sua aplicação (GÁBOR; 2000; ZEGARSKA et al., 2006). Com o objetivo de avaliar o efeito do EEVS em um modelo de inflamação cutânea neurogênica, o EEVS foi administrado 30 minutos antes da aplicação da capsaicina (200 μ g/orelha) na orelha direita de camundongos. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 30 minutos após a aplicação da capsaicina conforme descrito anteriormente (GABOR e RAZGA, 1992).

3.4.6. Edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica da histamina

O efeito do EEVS na reação de hipersensibilidade do tipo imediata foi avaliada através do modelo de edema de orelha induzido pela histamina. Para tal, os animais foram anestesiados com cetamina (0,02 mL) e xilazina (0,01 mL) e em seguida foi feita a medida da espessura da orelha. O volume de 5 μ L de uma solução de histamina (100 mg/ mL de salina) foi administrada, intradermicamente, na região ventral da orelha direita dos camundongos com o auxílio de uma agulha hipodérmica 30 G. O grupo SHAM foi submetido à administração do mesmo volume de salina. O EEVS (1 mg/20 μ L) foi aplicado topicamente na região dorsal da orelha direita dos animais 30 minutos

antes da administração da solução de histamina (BRAND et al, 2002). O edema foi avaliado 2 horas após a administração da histamina ou salina, considerando este o tempo no qual ocorre o pico máximo do edema.

3.4.7. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica da oxazolona

A dermatite de contato alérgica é definida como uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia que envolve duas fases: a fase de sensibilização ou indução e a fase efetora (RANG et al., 2007; BAS et al., 2007). Com o objetivo de avaliar o efeito do EEVS em uma resposta inflamatória de ação imediata, como verificada nas respostas alérgicas, foi utilizado o modelo de hipersensibilidade do tipo tardia induzido pela oxazolona. Este modelo se assemelha com as dermatites observadas em humanos, na qual se verifica a formação do edema, migração de leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T (CD_4^+ e CD_8^+) (BAS et al., 2007; FUJI et al., 2002).

Os animais foram sensibilizados através da aplicação tópica de 50 μ L de uma solução de oxazolona a 2% (p/v) em acetona na parte ventral (abdômen) dos animais por 2 dias consecutivos, sendo os animais tricotomizados na região abdominal 2 dias antes do início do experimento. Após 6 dias da sensibilização o desafio foi realizado, onde foi aplicado topicamente 30 μ L da solução de oxazolona a 2% (15 μ L/15 μ L em cada face) na orelha direita dos animais, sendo o EEVS administrado 1 hora antes da aplicação da oxazolona. A administração por via tópica do EEVS prosseguiu nos tempos de 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após o desafio, sendo o edema avaliado a cada 24 horas no decorrer desse período (RECIO et al., 2000). Após a avaliação do edema no último dia do experimento, foram coletadas amostras das orelhas (círculos de 6 mm do tecido) para avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase. Os linfonodos auriculares também foram retirados para serem submetidos à contagem de linfócitos T.

3.4.8. Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla do óleo de cróton

Para avaliar o efeito antiinflamatório do EEVS em um processo inflamatório já estabelecido, foi utilizado um modelo de inflamação crônica, caracterizado pela

aplicação múltipla do óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação do óleo de cróton (0,4 mg/orelha em 20 µL de acetona) em dias alternados durante 9 dias. O EEVS (1 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo), foram dissolvidos em 20 µL de acetona e posteriormente aplicados por via tópica durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do experimento, sendo o edema avaliado diariamente (STANLEY et al., 1991). No 9º dia do experimento os animais foram sacrificados e círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados para serem, posteriormente, submetidas a avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase e n-acetil-β-D-glucosaminidase, bem como a análise histológica e a contagem de leucócitos totais.

3.5. MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da enzima MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando a metodologia de Bradley et al. (1982) modificada por De Young et al. (1989). As amostras (círculos de 6 mm do tecido das orelhas de camundongos) foram adicionadas a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 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 minutos. Duplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, onde posteriormente foi adicionado 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5.4), 85 µL de PBS 0,22M (pH 5.4) e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8 %. A placa foi posteriormente incubada a 37°C por 3 minutos e a reação 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) com comprimento de onda de 620 nm, sendo expressa em mDO/tecido.

A avaliação do efeito direto do extrato sobre a atividade da MPO foi realizada através da incubação do extrato com a amostra do tecido submetida a uma única aplicação de TPA. O homogenato da amostra tecidual foi adicionado à placa e posteriormente incubado com diferentes concentrações do EEVS (0,3 – 30 μ M/mL) durante 15 minutos. Em seguida, foi realizado o protocolo descrito anteriormente.

3.6. MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA n-acetil- β -D glucosaminidase (NAG)

Para avaliar a atividade da enzima NAG é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares e foi realizada a partir de amostras de orelhas de camundongos submetidas à aplicação repetida do óleo de cróton no modelo de inflamação cutânea crônica, seguindo a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). As amostras do tecido (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram adicionadas a 0,75 mL de solução de fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e foram adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram adicionadas em microtubos e centrifugadas a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 25 μ L do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente foi adicionado 100 μ L de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 μ L de p-nitrofenil-acetamida- μ -D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido água miliQ. A seguir a placa foi incubada a 37°C por 1 h e a reação interrompida pela adição de 30 μ L de tampão glicina 200 mM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808), cuja leitura foi realizada na absorvância de 405 nm e os resultados expressos como mDO/tecido.

3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DA *V. scorpioides*

O ensaio da diclorofluoresceína consiste na quantificação do composto fluorescente 2'-7' diclorofluoresceína (DCFA), o qual é um indicador da formação de ROS. O composto fluorogênico diacetato de 2'-7' diclorofluoresceína (DCFA-DA) é amplamente utilizado como marcador do estresse oxidativo, pois quando adicionado a um meio biológico se liga rapidamente com espécies oxidantes, formando o composto fluorescente DCFA (KORYSTOV, et al., 2007; MYHRE et al., 2003; ROTA et al., 1999).

Os animais foram desafiados com TPA (do mesmo modo que esta descrito no item 4.4.2.) e os grupos experimentais tratados em seguida por via tópica com EEVS (0,6 mg/orelha), o composto isolado luteolina (0,6 mg/orelha) ou com o antioxidante ácido α -lipóico (0,6 mg/orelha), utilizado como controle positivo. Seguido 6 horas da aplicação tópica do TPA amostras de 6 mm de diâmetro da orelha dos camundongos foram coletadas, sendo diretamente homogenizadas em solução de PBS 80 a 4°C. Em seguida, os homogenatos foram incubados por 40 minutos com 0,4873 mg da sonda fluorescente diacetato de 2'-7' diclorofluoresceína (DSFA-DA) dissolvida em 50 μ l de DMSO, de forma a atingir uma concentração de 1 μ M. A intensidade de fluorescência promovida pela formação do composto fluorescente 2'-7' diclorofluoresceína (DCFA) foi mensurada através de um espectrofluorofotometro (RF-5301 PC, Shimadzu), com comprimento de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 520 nm (ROTA et al., 1999).

3.8. ANÁLISE DO MARCADOR DE SUPERFÍCIE CELULAR DA POPULAÇÃO DE LEUCÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A quantificação de leucócitos totais foi realizada utilizando a técnica de citometria de fluxo, através da marcação do CD₄₅, que é uma molécula de superfície comum a todos os leucócitos. Amostras de 6 mm de diâmetro de orelhas coletadas de camundongos submetidos à aplicação múltipla do óleo de cróton (item 3.4.8) foram

homogenizadas em 1 ml de PBS estéril em microtubo e filtrado num filtro filcon (100 µm) acoplado a uma seringa. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de PBS com 1% de soro fetal bovino (SFB) ao *pool* das orelhas de cada grupo, sendo em seguida submetidos à centrifugação (1200 rpm por 8 min). O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspendido em 1 mL de PBS (1% SFB) e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente, sendo esse processo repetido em seguida. Uma alíquota de 60 µL da suspensão do *pool* de cada grupo foi transferido para um tubo de citômetro e incubado com 1 µL do anticorpo anti-mouse CD₄₅ /FICT a 4°C por 30 min. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de PBS com SFB 1% e a suspensão foi novamente centrifugada, sendo esse processo repetido. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 300 µL de PBS e as células (10⁵) foram adquiridas no citômetro de fluxo (BD - FACS Calibur), pelo *software* CellQuest e os dados analisados no *software* WinMDI 2.9.

3.9. ANÁLISE DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A quantificação de linfócitos foi realizada por citometria de fluxo a partir dos linfonodos coletados de camundongos 24 horas após a fase efetora, submetidos ao modelo de hipersensibilidade do tipo tardia induzido pela oxazolona, para investigação de uma possível ação imunomoduladora do EEVS (item 3.4.7). O linfonodo foi processado nas mesmas condições descritas na técnica anterior (item 3.8.), com exceção dos anticorpos utilizados. Assim, alíquotas de 60 µL da suspensão do pool dos diferentes grupos foram incubados com 1 µL de diferentes anticorpos (anti-mouse CD₄/PE, CD₈/PE) a 4°C por 30 min. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de PBS com SFB 1% e a suspensão foi novamente centrifugada, sendo esse processo repetido. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 300 µL de PBS e as células (10⁵) foram adquiridas no citômetro de fluxo (BD - FACS Calibur), pelo *software* CellQuest e os dados analisados no *software* WinMDI 2.9.

3.10. ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras de orelhas coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pelo TPA e aplicação múltipla de óleo de cróton foram fixadas em solução ALFAC (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, blocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x. A quantificação dos leucócitos presentes na derme foi realizada através da contagem dessas células por campo com aumento de 400 x, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das DI_{50} (dose necessária para reduzir em 50% das respostas dos grupos tratados em relação ao grupo controle), que foram representados como a média geométrica acompanhada de seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman-Keuls e pelo teste “t” de student. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* version 3.00, San Diego Califórnia, EUA.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Vernonia scorpioides* (EEVS) NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA

Conforme demonstrado na figura 7, a aplicação tópica do TPA na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo da espessura da orelha após a sexta hora do desafio com esse agente flogístico. Esse evento foi efetivamente revertido de maneira dependente da dose, pela aplicação tópica do EEVS (0,003 – 1 mg/orelha) de forma a promover a inibição da formação do edema (I_{max}) de $81 \pm 2\%$ na dose de 1 mg/orelha e apresentando um valor de DI_{50} de 0,24 (0,1 – 0,55) mg/orelha. Os controles positivos utilizados, o glicocorticóide dexametasona (0,05 mg/orelha) e o inibidor não-seletivo da COX indometacina (2 mg/orelha) também promoveram a inibição do edema induzido por TPA ($88 \pm 2\%$ e $80 \pm 4\%$, respectivamente), enquanto o valor da DI_{50} da dexametasona e indometacina descrito na literatura é de 0,023 (0,016 – 0,034) mg/orelha e 0,35 (0,15 – 0,43) mg/orelha, respectivamente (GÁBOR, 2000; SHINELLA et al, 1998).

Os resultados obtidos demonstraram que não há diferença estatística entre o efeito anti-edematogênico do EEVS e dos agentes antiinflamatórios utilizados como controle positivo. Ainda, a aplicação tópica do veículo (acetona + Tween 80 + álcool), por sua vez, não induziu a formação do edema.

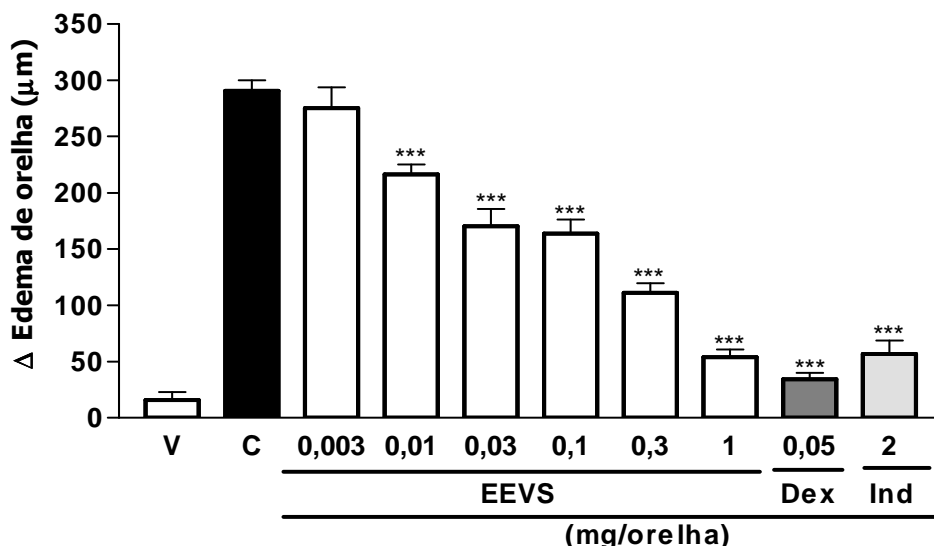


Figura 7: Curva dose-resposta do EEVS no edema de orelha induzido por TPA. Os animais foram desafiados com o TPA (C) e logo em seguida tratados com o EEVS (0,003 a 1 mg/orelha, tópico), dexametasona (Dex, 0,05 mg/orelha, tópico) ou indometacina (Ind, 2 mg/orelha, tópico). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média \pm E.P.M. ($n = 5-10$) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm). *** $p < 0,001$ representa o nível de significância em relação ao controle (C).

Posteriormente, foi avaliada a atividade da enzima MPO, que é um marcador enzimático da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado (LLORET e MORENO, 1995). Para tal, foram selecionadas as doses de 0,01; 0,1 e 1 mg/orelha do EEVS, baseado no resultado obtido na curva dose-resposta do modelo de edema de orelha induzido por TPA (figura 7). A aplicação tópica do TPA aumentou de forma intensa a atividade da MPO, na qual foi inibida significativamente pela aplicação tópica das doses de 0,1 e 1 mg/orelha, e dos controles positivos dexametasona (0,05 mg/orelha) e indometacina (0,05 mg/orelha). A inibição máxima da atividade da MPO dos animais tratados com 1 mg/orelha do EEVS foi de $77 \pm 8 \%$, enquanto a inibição da atividade desta enzima promovida pela dexametasona foi $80 \pm 3\%$ (figura 8), estando esse resultado de acordo com a literatura onde está descrito uma inibição da atividade da MPO de 93% para a dexametasona (GÁBOR, 2000).

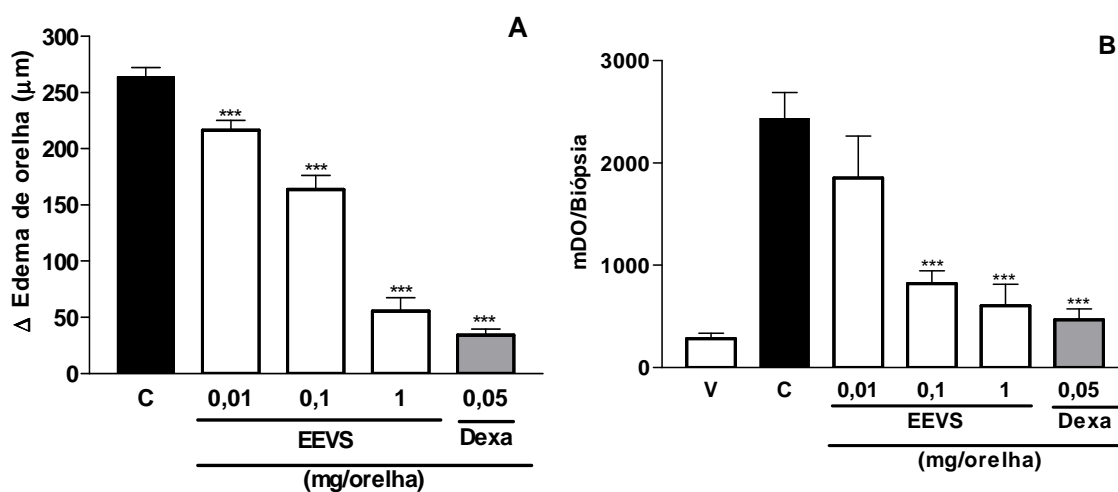


Figura 8: Efeito do EEVS sobre o edema de orelha e aumento na atividade da MPO induzida pelo TPA. Os animais foram desafiados com o TPA (C) e logo em seguida tratados com o EEVS (0,01 a 1 mg/orelha, tópico) ou dexametasona (Dexa, 0,5 mg/orelha, tópico). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro (A) e foram obtidas amostras das orelhas para avaliação da atividade da MPO (B). As barras representam a média \pm E.P.M. (n = 5-10) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μ m). Animais tratados com o veículo (V). *** $p < 0,001$ representa o nível de significância em relação ao controle (C).

A inibição da atividade da MPO pelo EEVS pode resultar de uma inibição direta desta enzima ou da inibição da migração de neutrófilos no tecido. Assim, na tentativa de determinar qual desses dois processos está sendo inibido pela aplicação tópica do EEVS, foi realizada a avaliação do efeito *in vitro* do EEVS sobre a atividade da MPO. Para tal, foram utilizadas amostras do tecido (6 mm de diâmetro da orelha) previamente submetidos à aplicação tópica de TPA (24 h), porém sem tratamento com o EEVS. Na figura 9, pode-se observar que a incubação direta do homogenato das amostras com o EEVS em diferentes concentrações (0,3 – 30 μ g/mL) não alterou a atividade da MPO quando comparada ao grupo controle, indicando que o EEVS não exerce sua ação diretamente sobre esta enzima.

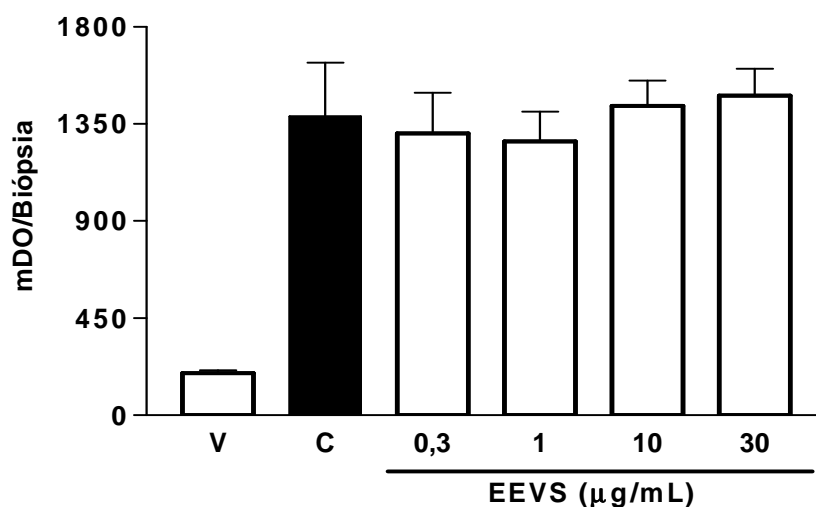


Figura 9: Efeito do EEVS sobre a atividade da enzima MPO *in vitro*. Os animais foram desafiados com TPA (C), com exceção do grupo veículo que receberam a aplicação de acetona (V). Amostras de 6 mm de diâmetro das orelhas dos animais de cada grupo foram homogenizadas e incubadas durante 15 minutos com diferentes concentrações de EEVS (0,3-30 µg/mL). A atividade enzimática foi quantificada através de leitor de placa (620 nm). Os valores estão expressos como média ± EPM (n=4).

Para confirmação do efeito antiinflamatório do EEVS verificado nos experimentos anteriores, foi realizada a análise histológica dos parâmetros de inflamação relativos à aplicação do extrato. A análise dos cortes histológicos das orelhas dos camundongos demonstrou que após 24 horas da aplicação tópica do TPA ocorre uma formação bastante intensa de edema, bem como uma pronunciada infiltração de leucócitos polimorfonucleares na derme (figura 10B). A histologia também revelou que os parâmetros inflamatórios (edema e infiltração leucocitária) foram suprimidos pela aplicação tópica do EEVS (1 mg/orelha) (figura 10C), bem como pelo controle positivo dexametasona (0,05 mg/orelha) (figura 10D), sendo a inibição da infiltração leucocitária confirmada através da quantificação dos neutrófilos presentes da derme (tabela 1).

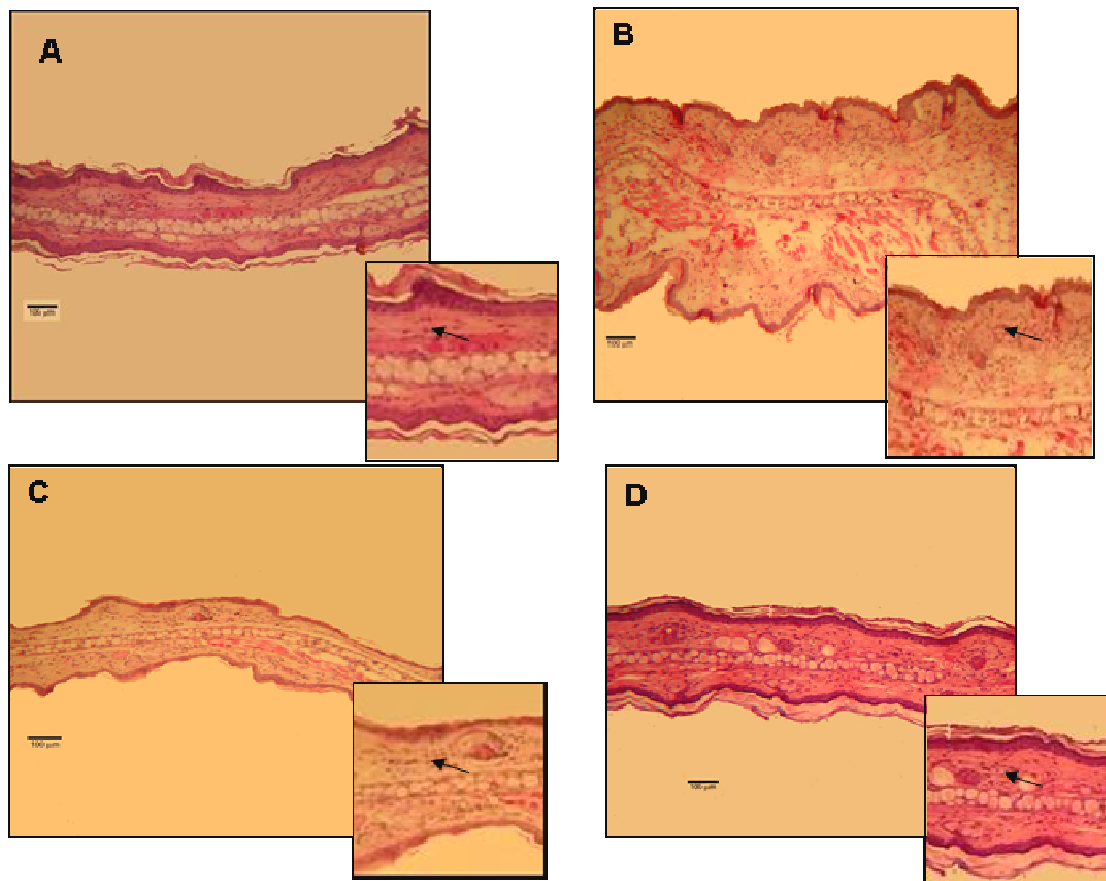


Figura 10: Análise histológica do efeito do EEVS sobre o edema e infiltrado leucocitário no modelo de edema de orelha induzido por TPA. Fotos representativas de cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x, escala de 100 µm) coletadas 24 horas após a aplicação do TPA. (A) veículo, (B) controle (TPA), (C) animal tratado com EEVS (1 mg/orelha) ou (D) dexametasona (0,05 mg/orelha). As flechas indicam a presença de neutrófilos.

Tabela 1
Quantificação de neutrófilos em amostras de orelhas do modelo de edema de orelha induzido por TPA

Média do número de neutrófilos observados por campo

Veículo	Controle	EEVS	Dexa
12.2	74.6	36.4	29.3

* A quantificação de neutrófilos foi realizada com aumento de 400 x, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos de cada grupo de animais.

Na tentativa de verificar se EEVS administrado por via oral mantém a atividade antiinflamatória, como quando aplicado topicamente, os animais foram tratados com uma dose de 1000 mg/Kg, v.o., 1 h antes da indução do edema com o TPA. No entanto, conforme demonstrado na figura 11, o EEVS não se mostrou ativo sobre o edema de orelha quando este extrato é administrado por via oral.

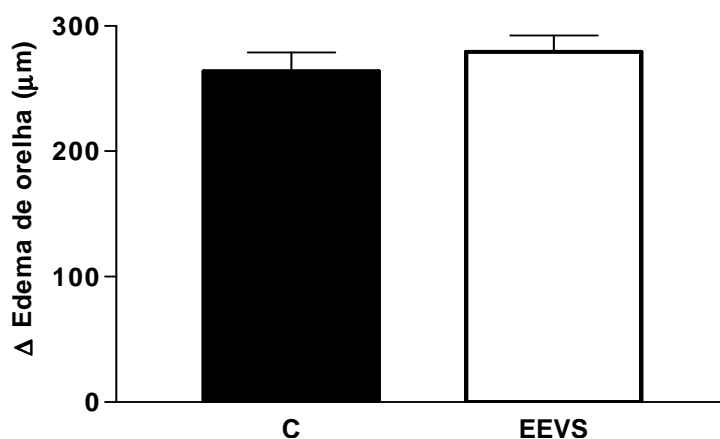


Figura 11: Efeito do EEVS por via oral sobre o edema de orelha induzido por TPA. Os animais foram pré-tratados com EEVS por via oral (1000 mg/Kg) 1 h antes da aplicação tópica do TPA, enquanto o outro grupo foi desafiado com TPA (C). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média \pm E.P.M. (n = 5) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm).

4.2. EFEITO TÓPICO DAS DIFERENTES FRAÇÕES DA *Vernonia scorpioides* NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA

Após a constatação da atividade antiinflamatória do EEVS, foi verificado o efeito das diferentes frações obtidas a partir do EEVS também no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA, com o objetivo de identificar qual das frações poderia conter o(s) composto(s) envolvidos na atividade anti-edematogênica da *V. scorpioides*. Da mesma forma que o extrato, as frações hexano (Hex), acetato enriquecido (AceE), acetato (Ace) e diclorometano (DCM), na dose de 0,5 mg/orelha, foram capazes de reduzir o edema de orelha induzido por TPA, conforme demonstrado na figura 13. A inibição do edema promovida pelas frações Hex, AcetE, Acet e DCM foram $35 \pm 8\%$, $53 \pm 4\%$, $57 \pm 5\%$, $70 \pm 5\%$, respectivamente, enquanto para o EEVS foi $72 \pm 14\%$ e para dexametasona (controle positivo) $87 \pm 3\%$.

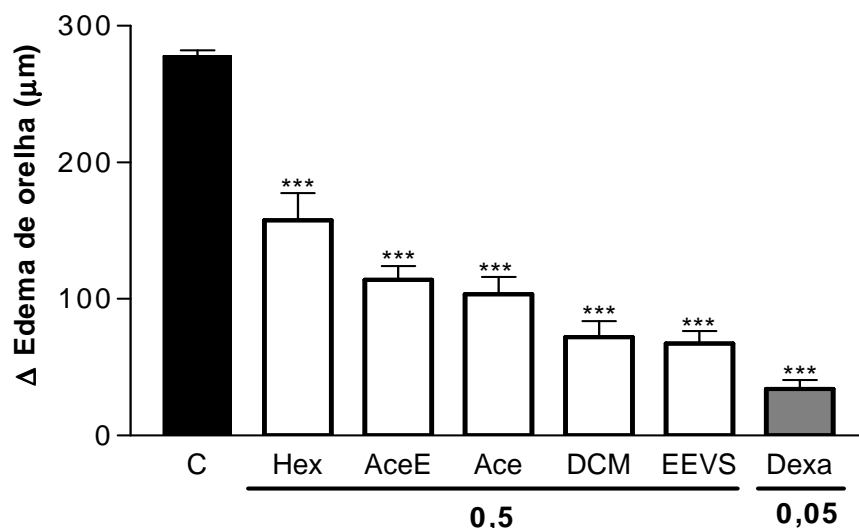


Figura 12: Efeito do EEVS e das frações da *Vernonia scorpioides* sobre o edema de orelha induzido por TPA. Os animais foram desafiados com o TPA (C) e logo em seguida tratados com o EEVS, as frações hexano (Hex), acetato enriquecido (AceE), acetato (Ace), diclorometano (DCM) (0,5 mg/orelha, tópico) e dexametasona (Dexa_0,05 mg/orelha). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média \pm E.P.M. (n = 5-8) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm). *** $p < 0,001$ representa o nível de significância em relação ao controle (C).

Como todas as frações testadas no modelo de edema de orelha induzido por TPA apresentaram atividade antiedematogênica, o passo seguinte foi realizar a curva dose-resposta das frações para comparação da potência (obtenção da DI_{50}). Os resultados apresentados da figura 13 mostram que as frações DCM e Ace foram capazes de inibir a formação do edema induzido por TPA de maneira dose-dependente, com uma inibição máxima de $63 \pm 6\%$ na dose de 0,6 mg/orelha e DI_{50} de 0,4 (0,23-0,71) mg/orelha para a fração DCM, e inibição máxima de $66 \pm 6\%$ (0,6 mg/orelha) e DI_{50} de 0,08 (0,05-0,11) mg/orelha para a fração Ace. Diante dos valores de DI_{50} para ambas as frações, verifica-se que o efeito antiedematogênico da fração Ace é mais potente que o efeito da fração DCM. As frações AceE e Hex, embora tenham apresentado atividade antiedematogênica com inibição máxima de $54 \pm 7\%$ e $31 \pm 4\%$, respectivamente, não demonstraram um efeito dose-dependente. Da mesma forma que o EEVS, as frações

Ace e DCM da *V. scorpioides* também inibiram a atividade da MPO quando administradas topicamente, apresentando uma I_{max} de $78 \pm 1\%$ (0,6 mg/orelha) e $63,5 \pm 5\%$ (0,1 mg/orelha), respectivamente. Porém esse tratamento não promoveu um efeito dose-dependente para o efeito sobre a atividade desta enzima (Figura 14).

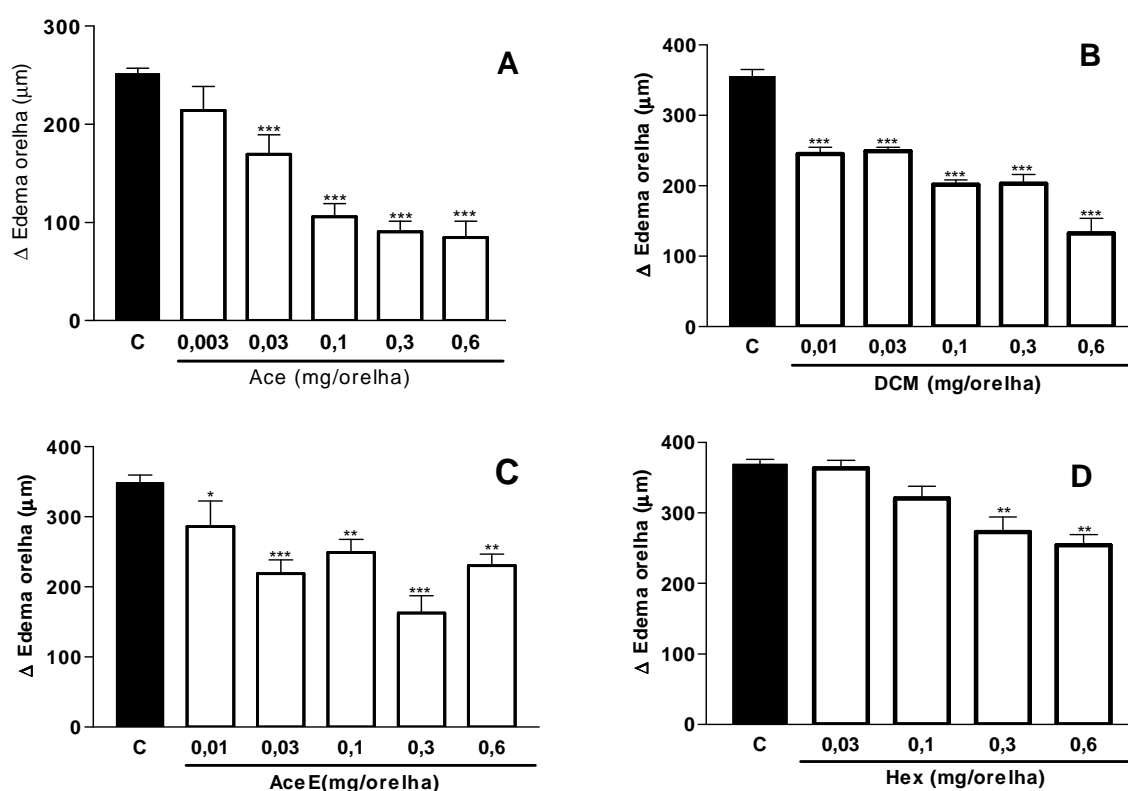


Figura 13: Curva dose-resposta de diferentes frações obtidas do EEVS no edema de orelha induzido por TPA. Os animais foram desafiados com o TPA e logo em seguida tratados com a fração Ace (A), DCM (B), AceE (C) e Hex (D) (0,003 a 0,6 mg/orelha, tópico). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média \pm E.P.M. (n=4-5) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ representam o nível de significância em relação ao controle (C).

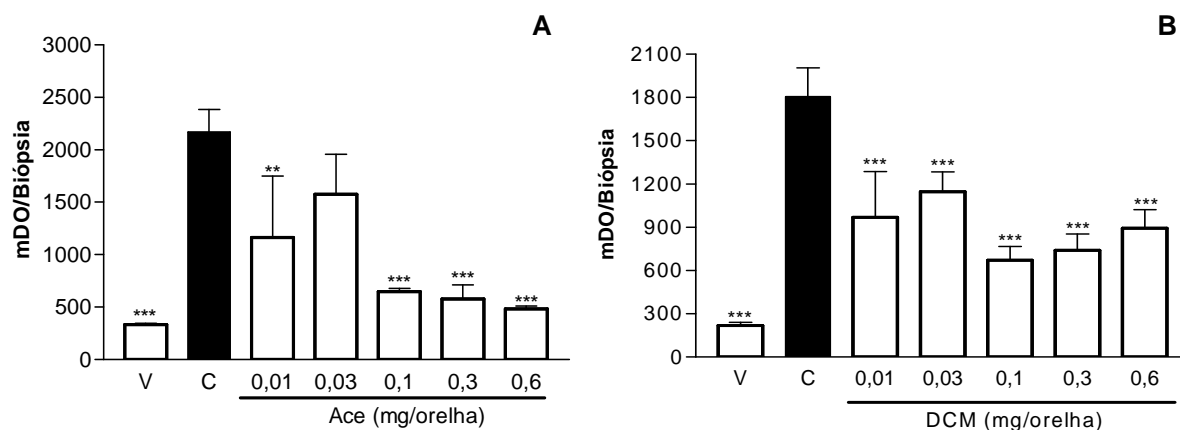


Figura 14: Efeito da fração Ace e DCM da *Vernonia scorpioides* sobre o aumento da atividade da MPO induzida pelo TPA. Os animais foram desafiados com o TPA (C) e logo em seguida tratados com doses crescentes (0,01-0,6 mg/orelha, tópico) das frações Ace (A) e DCM (B). Após 24 horas foram obtidas amostras das orelhas para avaliação da atividade da MPO. As barras representam a média \pm E.P.M. (n = 5-6) do aumento da atividade da MPO. Animais tratados com o veículo (V). **, $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representam o nível de significância em relação ao controle (C).

4.3. EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Vernonia scorpioides* (EEVS) E DO COMPOSTO ISOLADO LUTEOLINA

A figura 15A mostra que o composto isolado luteolina (0,6 mg/orelha) reverte de forma significativa o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA, promovendo uma inibição de $44 \pm 11\%$ frente a $68 \pm 8\%$ da inibição decorrente da aplicação tópica do EEVS (0,6 mg/orelha). Em relação ao efeito antioxidante, o EEVS, o composto isolado luteolina e o controle positivo ácido α -lipóico, reduziram significativamente a formação de espécies reativas de oxigênio conforme verificado com a diminuição de intensidade de fluorescência emitida pelo composto fluorescente DCFA, porém o EEVS se mostrou mais efetivo que a luteolina e o ácido α -lipóico em relação a atividade antioxidante (figura 15B).

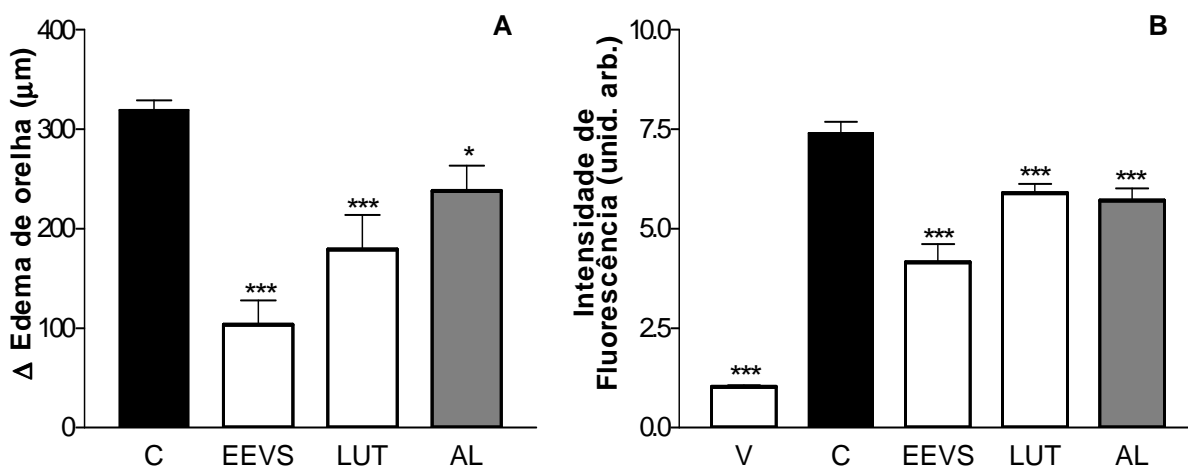


Figura 15: Efeito antioxidante do EEVS e do composto isolado luteolina em modelo de edema de orelha induzido por TPA. Os animais foram desafiados com o TPA (C) e logo em seguida tratados com o EEVS (0,6 mg/orelha), luteolina (LUT) (0,6 mg/orelha) e com o controle positivo ácido α -lipóico (AL) (0,6 mg/orelha). Após 6 horas a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro (A) e foram obtidas amostras das orelhas para avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (B). As barras representam a média \pm E.P.M. (n = 5-10) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μ m). Animais tratados com o veículo (V). ***p<0,001 representa o nível de significância em relação ao grupo controle (C).

4.4. EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Vernonia scorpioides* (EEVS) NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

O ácido araquidônico promoveu a formação do edema após 1 hora da sua aplicação tópica, da mesma forma que descrito na literatura (YOUNG *et al.*, 1984; CRUMMEY *et al.*, 1987). A aplicação tópica do EEVS (0,03 a 1 mg/orelha) no edema induzido pelo ácido araquidônico, foi capaz de promover uma redução dose-dependente do edema de orelha, apresentando um valor de DI_{50} de 0,68 (0,41-1,13) mg/orelha e I_{max} de $60 \pm 8\%$ na dose de 1 mg/orelha, enquanto o controle positivo indometacina (2 mg/orelha) promoveu uma inibição de $65 \pm 5\%$ do edema induzido pelo ácido araquidônico, conforme demonstrado na figura 16. A DI_{50} estimada para a indometacina no modelo do ácido araquidônico é de 0,4 mg/orelha (GÁBOR, 2000).

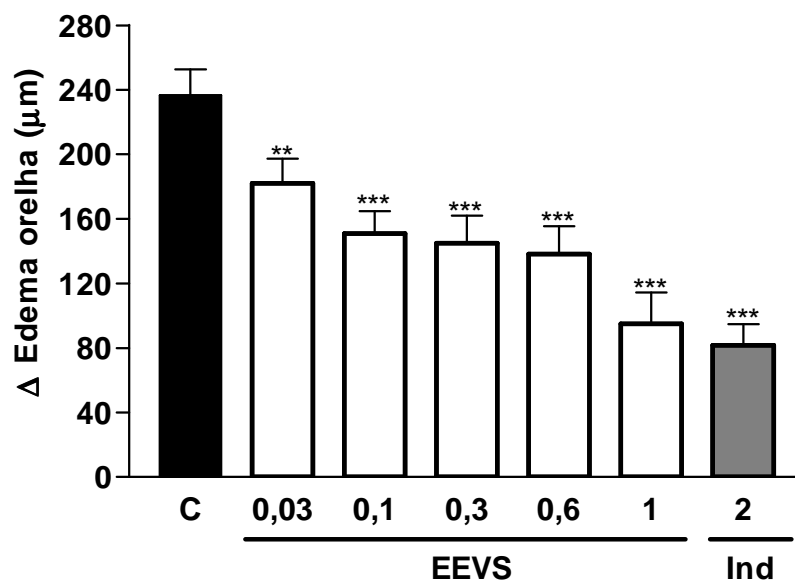


Figura 16: Curva dose-resposta do EEVS no edema de orelha induzido por ácido araquidônico. Os animais foram desafiados com o AA (2 mg/orelha) e logo em seguida tratados com o EEVS (0,03 a 1 mg/orelha, tópico) ou indometacina (Ind, 2 mg/orelha, tópico). Após 1 hora a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média \pm E.P.M. (5-8) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ representa o nível de significância em relação ao controle (C).

4.5. EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Vernonia scorpioides* (EEVS) NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR FENOL

Conforme descrito na literatura, foi verificada uma formação intensa do edema na orelha dos animais do grupo controle 1 hora após a aplicação tópica do fenol. Em contrapartida, a aplicação tópica do EEVS (1 mg/orelha), bem como da dexametasona (0,1 mg/orelha), promoveu uma inibição significativa da formação do edema induzido pela aplicação deste agente irritante, sendo verificada uma inibição de $88 \pm 6\%$ para o EEVS e de $91 \pm 9\%$ para a dexametasona.

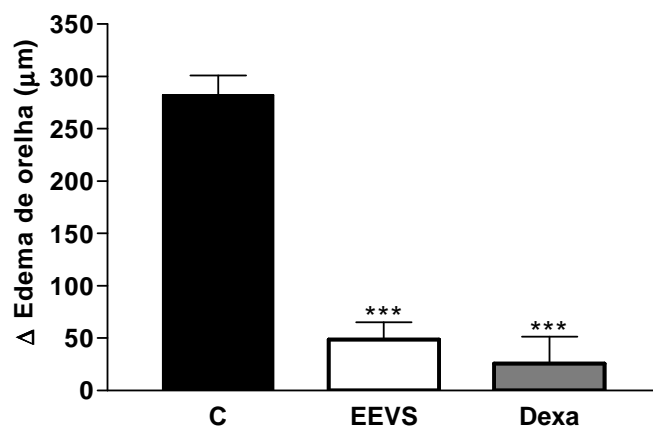


Figura 17: Efeito do EEVS no edema de orelha induzido por fenol. O edema foi induzido pela aplicação tópica de uma solução a 10% de fenol (20 μL/orelha), seguido da aplicação do EEVS (1 mg/orelha, tópico) ou dexametasona (Dexa, 0,1 mg/orelha, tópico). Após 1 hora a espessura da orelha dos animais foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média ± E.P.M. (n = 5-8 animais) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm). *** p<0,001 representa o nível de significância em relação ao controle (C).

4.6. EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Vernonia scorpioides* (EEVS) NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR CAPSAICINA

A aplicação tópica da capsaicina (200 μg/orelha) induziu a formação de edema com uma intensidade máxima no tempo de 30 minutos. O pré-tratamento dos animais com 1 mg/orelha do EEVS preveniu a formação do edema induzido pela capsaicina, onde foi verificado uma inibição de 25 ± 7%, conforme demonstrado na figura 18.

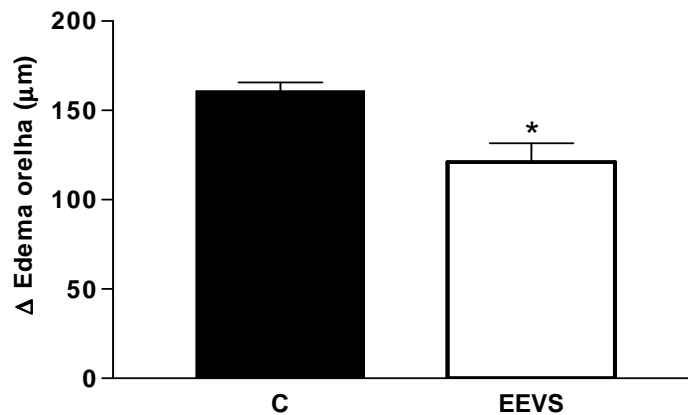


Figura 18: Efeito do EEVS no edema de orelha induzido por capsaicina. Os animais foram pré-tratados com o EEVS (1 mg/orelha) por via tópica 30 minutos antes da aplicação da capsaicina (200 μg/orelha). Após 30 minutos do desafio com a capsaicina, a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média ± E.P.M. (n = 5-8 animais) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm). *p<0,05 representa o nível de significância em relação ao controle (C).

4.7. EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Vernonia scorpioides* (EEVS) NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR HISTAMINA

A aplicação intradérmica de uma solução de histamina na orelha de camundongos resultou no aumento da espessura da orelha que foi significativamente maior que o observado no grupo submetido à administração somente com salina, quando avaliado 2 horas após as respectivas injeções. A aplicação tópica prévia do EEVS (1 mg/orelha) promoveu uma inibição de $25 \pm 7\%$ do edema induzido pela histamina, demonstrando assim um efeito anti-edematogênico desse extrato nesse modelo.

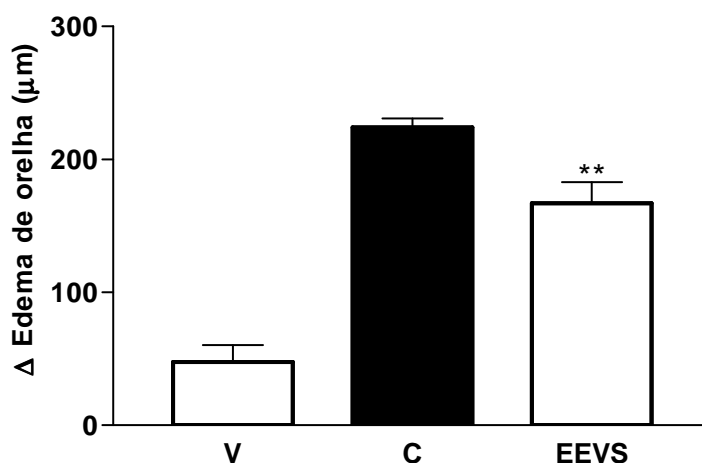


Figura 19: Efeito do EEVS no edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica da histamina. Os animais foram pré-tratados com o EEVS (1mg/orelha) por via tópica 30 minutos antes da administração intradérmica da solução de histamina (100 μg/5 μL). Após 2 horas, a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrometro. As barras representam a média ± E.P.M. (n = 5 animais) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm). Animais tratados com o veículo (V). **p<0,01 representa o nível de significância em relação ao controle (C).

4.8. EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Vernonia scorpioides* (EEVS) NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR OXAZOLONA

A sensibilização prévia dos animais com a oxazolona, fase que representa o primeiro contato do animal com o hapteno, promoveu a formação do edema que perdurou até 96 h após o desafio (Figura 20). Entretanto, esse efeito não foi observado nos animais que não foram expostos a oxazolona na fase de sensibilização (não-sensibilizados). Essa resposta inflamatória, cujo parâmetro avaliado foi o edema, foi reduzida significativamente já nas primeiras 24 horas após a aplicação tópica do EEVS (1 mg/orelha), onde foi verificada uma inibição de $42 \pm 9\%$. O efeito do extrato se estendeu até 96 h após o desafio, quando ainda apresentava uma inibição de $38 \pm 12\%$. Efeito inibitório semelhante foi obtido com o glicocorticóide dexametasona (0,05 mg/orelha), usado como controle positivo deste modelo (figura 20 A). Entretanto, o EEVS (1

mg/sítio) quando administrado somente na fase de sensibilização não reverteu a formação do edema quando o animal foi novamente exposto ao hapteno oxazolona (figura 20 B).

Por outro lado, como observado na figura 20B, o tratamento com EEVS (1 mg/orelha), realizado somente na fase efetora, foi capaz de promover a inibição da formação do edema de forma significativa nas primeiras 24 horas (Inibição de $63 \pm 4\%$). Esse efeito inibitorio do EEVS persistiu até 96 horas após o desafio (Inibição de $40 \pm 11\%$), da mesma forma que o verificado quando o animal é submetido ao tratamento com o EEVS nas duas fases de exposição ao hapteno.

O modelo de hipersensibilidade de contato tem sido considerado com um modelo útil na ativação de células T nos linfonodos (HOMEY *et al*, 1998). Assim, para verificar um possível efeito imunossupressor do EEVS na reação de hipersensibilidade tardia foi investigada a ação desse extrato sobre a proliferação dos linfócitos T presentes no linfonodo auricular (linfócitos T CD_4^+ e CD_8^+), através da técnica de citometria de fluxo (figura 21). O tratamento tópico com EEVS (1 mg/sítio) na fase de sensibilização e fase efetora revelou não atuar sobre a proliferação dos linfócitos CD_4 e CD_8 presentes no linfonodo auricular quando a porcentagem de linfócitos foi comparada ao grupo controle, da mesma forma a porcentagem de linfonodos desses grupos também não foi diferente ao dos animais não sensibilizados, podendo esse resultado ser observado na figura 21 e 22.

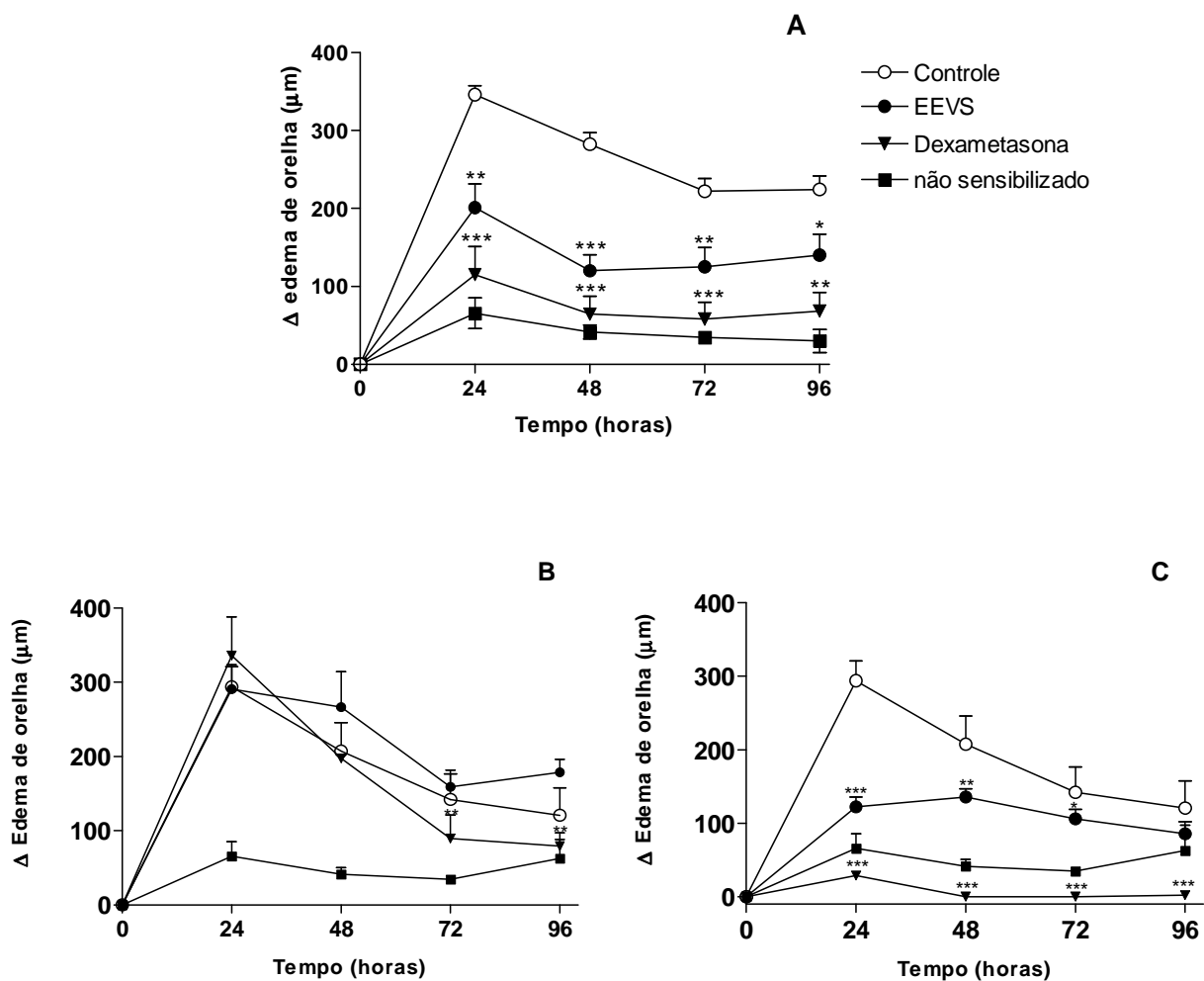


Figura 20: Efeito do EEVS no modelo de hipersensibilidade tardia induzido pela oxazolona. Os animais foram sensibilizados e 6 dias após foram novamente expostos à oxazolona (desafio). Para o desafio os animais receberam na orelha solução de oxazolona a 2% (15 μL em cada face), e depois de 1 h foram tratados topicamente com veículo (controle), EEVS (1 mg/orelha) ou dexametasona (0,05 mg/orelha) na fase de sensibilização e fase efetora **(A)**; somente na fase de sensibilização **(B)** e somente na fase efetora **(C)**. Outro grupo de animais, que não foram previamente sensibilizados, foi tratado somente com oxazolona na orelha direita (não sensibilizados). Os valores estão expressos como média ± EPM (n=5-6) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm). *** p<0,001; **p<0,01; *p<0,05 representam o nível de significância em relação ao grupo controle.

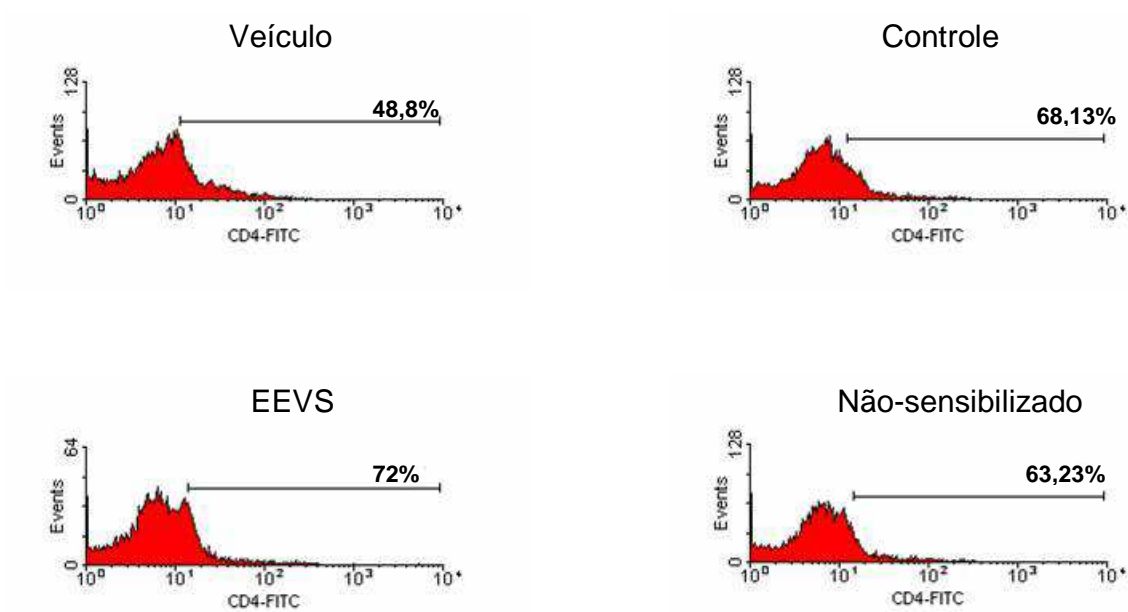


Figura 21: Efeito do EEVS sobre a proliferação de linfócitos T CD₄ na hipersensibilidade do tipo tardia. O grupo de animais não sensibilizados (NS) foi exposto a oxazolona somente na fase efetora, enquanto o grupo controle foi exposto a oxazolona na fase de sensibilização e fase efetora. O tratamento com o EEVS (1 mg/sítio) foi realizado por via tópica nestas duas fases em animais sensibilizados. Amostras do pool de linfonodos auriculares de animais de cada grupo (10⁻⁵ células/grupo) foram analisadas por citometria de fluxo, após marcação com anticorpos específicos (anti-mouse CD₄/PE).

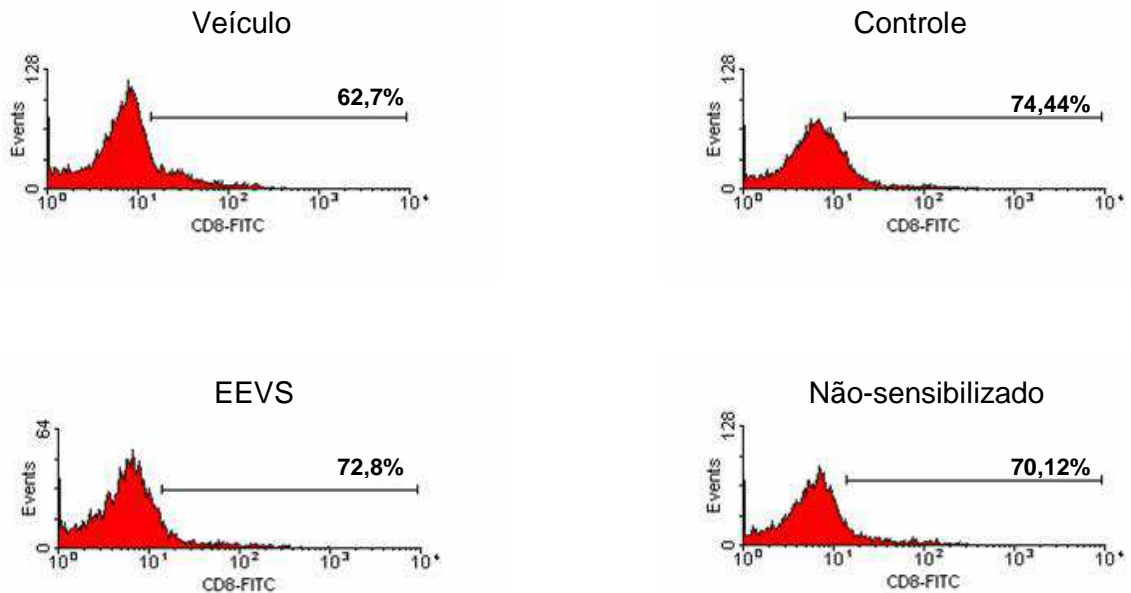


Figura 22: Efeito do EEVS sobre a proliferação de linfócitos T CD₈ na hipersensibilidade do tipo tardia. O grupo de animais não sensibilizados (NS) foi exposto a oxazolona somente na fase efetora, enquanto o grupo controle foi exposto a oxazolona na fase de sensibilização e fase efetora. O tratamento com o EEVS (1 mg/sítio) foi realizado por via tópica nestas duas fases em animais sensibilizados. Amostras do pool de linfonodos auriculares de animais de cada grupo (10⁻⁵ células/grupo) foram analisadas por citometria de fluxo, após marcação com anticorpos específicos (CD₈/PE).

A infiltração leucocitária no modelo de hipersensibilidade tardia também foi investigada através da avaliação da atividade da enzima MPO. Amostras das orelhas dos animais tratados com o EEVS nas duas fases (sensibilização e efetora) foram coletadas 24 horas após a segunda exposição do animal com a oxazolona, período em que o edema atingiu o pico máximo. O resultado demonstrado na figura 23 revela que o tratamento tópico com o EEVS (1 mg/sítio) inibe a atividade da enzima MPO de forma significativa ($53 \pm 16\%$), enquanto os animais que não foram expostos a oxazolona na fase de sensibilização (não sensibilizados) não apresentaram um aumento da atividade da MPO quando comparado com o grupo controle, não diferindo estatisticamente do grupo veículo.

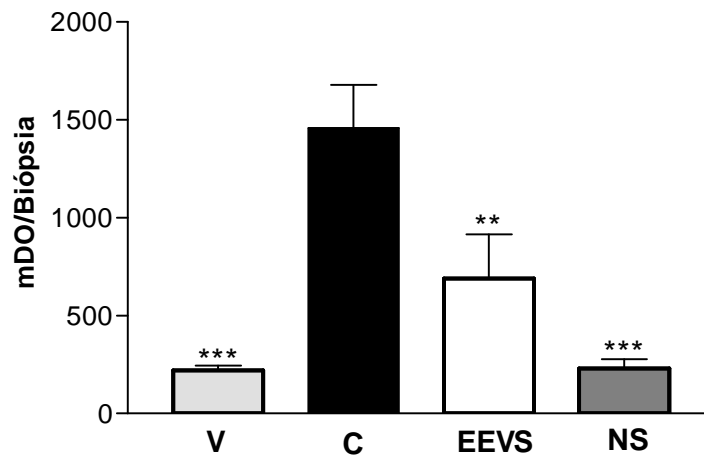


Figura 23: Efeito do EEVS sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no modelo de hipersensibilidade do tipo tardia induzida por oxazolona. Amostras das orelhas dos animais tratados com o EEVS (1 mg/sítio) em ambas as fases de exposição a oxazolona foram coletadas 24 horas após a fase efetora para avaliação da atividade da MPO. Animais tratados com o veículo (V) e animais não sensibilizados (NS). Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=5). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representam o nível de significância em relação ao controle (C).

4.9. EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Vernonia scorpioides* (EEVS) NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE ÓLEO DE CRÓTON

A aplicação repetida de óleo de cróton em orelhas de camundongos promove uma resposta inflamatória crônica caracterizada por edema, infiltração celular predominante de células mononucleares e hiperproliferação celular na epiderme (STANLEY *et al.*, 1991). A figura 24A demonstra que, após o estabelecimento do processo inflamatório crônico por aplicação repetida de óleo de cróton, o tratamento crônico com o EEVS (1 mg/orelha) e com a dexametasona (0,05 mg/orelha) foi capaz de promover a reversão

do edema de forma significativa, apresentando no nono dia de tratamento uma inibição do edema de $31 \pm 2\%$ e $30 \pm 9\%$, respectivamente. A infiltração de leucócitos mononucleares é característica nesse modelo, assim a avaliação da atividade da NAG é uma medida indireta da infiltração desses tipos celulares na derme. A figura 24B demonstra que o EEVS não foi capaz de inibir a atividade da NAG; causando uma alteração de somente $14 \pm 7\%$ na resposta não sendo estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. A dexametasona (controle positivo) promoveu uma inibição significativa ($25 \pm 7\%$) da atividade da NAG, demonstrando que esse agente antiinflamatório inibe a infiltração de leucócitos mononucleares. A avaliação da atividade da MPO permite sugerir que tanto o EEVS como o controle positivo dexametasona promovem a inibição da infiltração de neutrófilos ($25 \pm 10\%$ e $57 \pm 8\%$, respectivamente) casada pelo óleo de cróton, conforme observado na figura 24C.

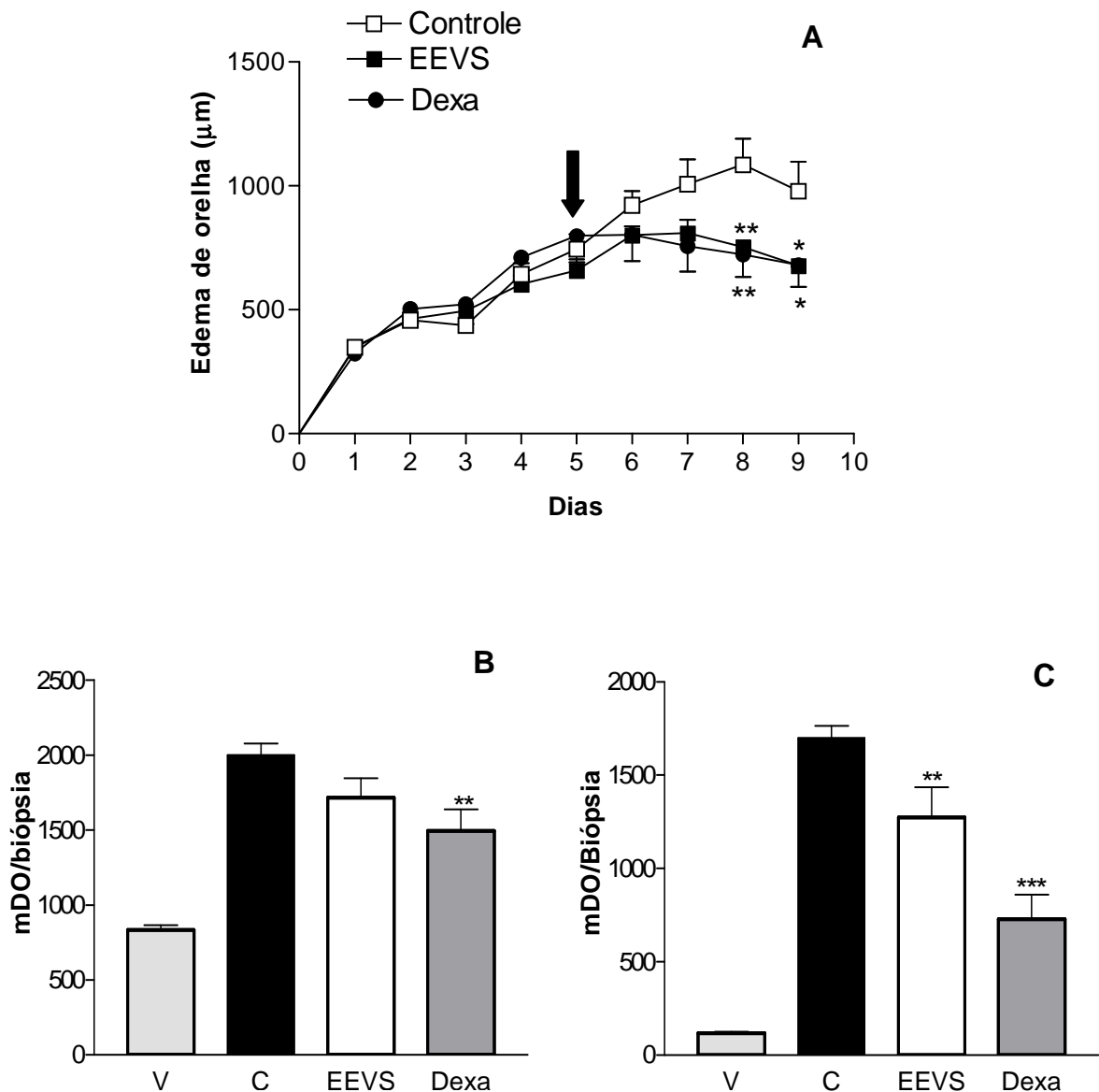


Figura 24: Efeito do EEVS no edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. O EEVS (1 mg/orelha) e a dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados topicamente durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton e a espessura da orelha medida diariamente (A). No último dia de tratamento amostras das orelhas foram coletadas para avaliação da atividade da NAG (B) e MPO (C). Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6). *** p< 0,001; ** p< 0,01 e *p<0,05 representam o nível de significância em relação ao controle (C).

Os parâmetros da inflamação, como a infiltração leucocitária, edema e hiperproliferação celular, também foram avaliados através da análise histológica. Na figura 25 pode-se observar a inibição do edema tanto no grupo tratado com o EEVS (1 mg/orelha) como no grupo tratado com a dexametasona (0,05 mg/orelha). Além disso, também foi verificada uma intensa infiltração leucocitária no grupo controle e no grupo submetido ao tratamento com EEVS, mas não no grupo tratado com dexametasona, confirmando assim os resultados obtidos anteriormente (figura 20). A aplicação repetida do óleo de cróton na orelha dos camundongos também promove uma hiperproliferação marcante dos queratinócitos, caracterizado por um aumento na espessura da epiderme (acantose). A aplicação múltipla desse agente flogístico promoveu um aumento cerca de 8 vezes maior da espessura da epiderme em relação ao grupo que recebeu apenas veículo (acetona). Ao passo que, o tratamento tópico com o EEVS e com a dexametasona foram capazes de inibir a hiperproliferação celular induzida pela aplicação múltipla do óleo de cróton.

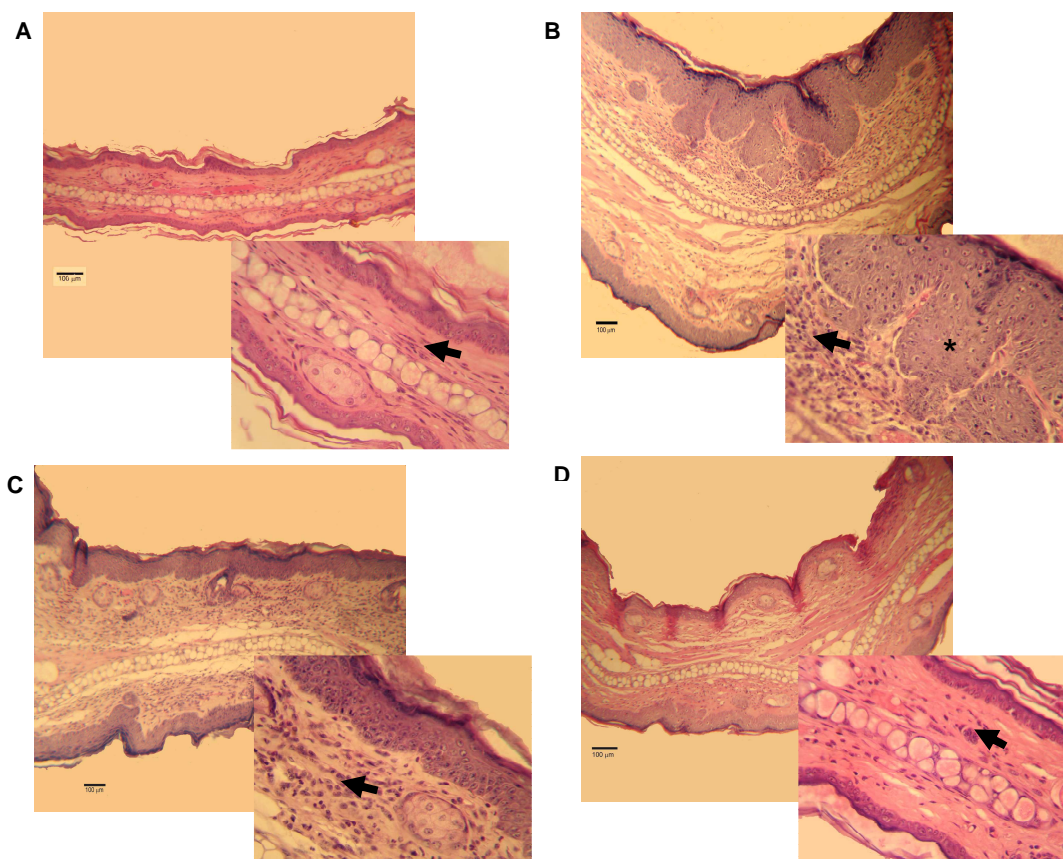


Figura 25: Análise histológica do efeito do EEVS sobre o edema, infiltrado leucocitário e hiperproliferação epidérmica no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton. Fotos representativas de cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x, escala de 100 µm) coletadas após a aplicação repetida de óleo de cróton. **(A)** veículo, **(B)** controle, **(C)** animal tratado com o EEVS (1 mg/orelha) e **(D)** dexametasona (0,05 mg/orelha). As flechas indicam a infiltração de leucócitos e o asterisco indica hiperplasia epidérmica (acantose).

A ação do EEVS sobre a infiltração leucocitária no modelo de inflamação crônica foi confirmada pela quantificação dos leucócitos totais presentes no tecido inflamado utilizando a técnica de citometria de fluxo. Foi feita a detecção de células que expressam a molécula CD₄₅ em sua superfície, que é caracteristicamente um marcador comum para os leucócitos. Dentre as células presentes no pool do grupo controle foi verificado que 36% eram leucócitos, enquanto no grupo submetido à aplicação tópica

do veículo apenas 2,6% representaram esse tipo celular. Os grupos tratados com o EEVS (1 mg/orelha) e a dexametasona (0,05 mg/orelha) apresentaram valores inferiores ao grupo controle, onde 27% e 23% , respectivamente, representam a presença de leucócitos no *pool* analisado (figura 26).

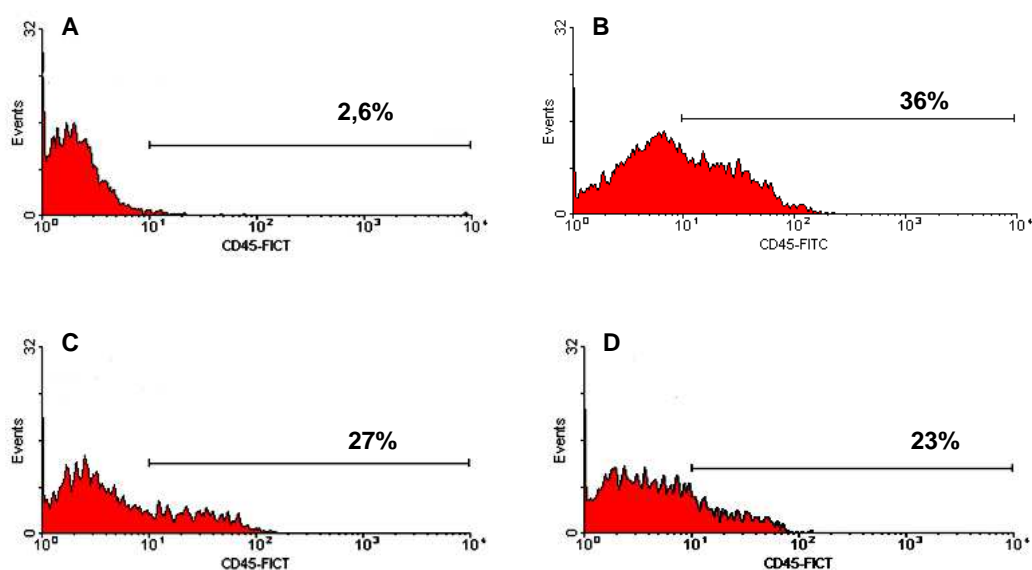


Figura 26: Efeito do EEVS sobre a infiltração de leucócitos totais no tecido durante o processo inflamatório crônico. O óleo de cróton foi administrado topicamente nos animais em dias alternados durante 9 dias. O EEVS (1 mg/orelha) e a dexametasona (0,05 mg/orelha) foram aplicados, também por via tópica, 2 vezes ao dia após o quinto dia do início do experimento. Os animais foram sacrificados no nono dia do experimento e amostras das orelhas foram coletadas, sendo posteriormente homogenizadas. Amostras do pool das orelhas dos animais de cada grupo (10^5 células/grupo) foram analisadas por citometria de fluxo, após marcação com anticorpo específico (anti-mouse $CD_{45}/FICT$) das células que expressam a molécula CD_{45} em sua superfície (leucócitos). Dentre as células presentes no pool analisado, 2,6%; 36%; 27% e 23% representam leucócitos no grupo veículo (A), grupo controle (B), grupo tratado com EEVS (C) e Dexametasona (D), respectivamente.

4.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DA *Vernonia scorpioides* (EEVS)

A estabilidade do EEVS foi avaliada a fim de constatar se as condições de armazenamento eram adequadas para preservar a atividade farmacológica dos compostos presentes nesse extrato. Para tal, a atividade anti-edematogênica do EEVS foi avaliada em vários períodos no decorrer do tempo em que os experimentos do presente trabalho foram conduzidos, utilizando para tal o modelo de edema de orelha induzido por TPA. Na figura 27 pode-se observar que a atividade farmacológica do EEVS; avaliada através da comparação da inibição do edema de orelha em diferentes tempos, manteve-se durante o período de 570 dias, demonstrando assim que as condições de armazenamento não interferiram na atividade dos compostos responsáveis pela propriedade anti-edematogênica do EEVS.

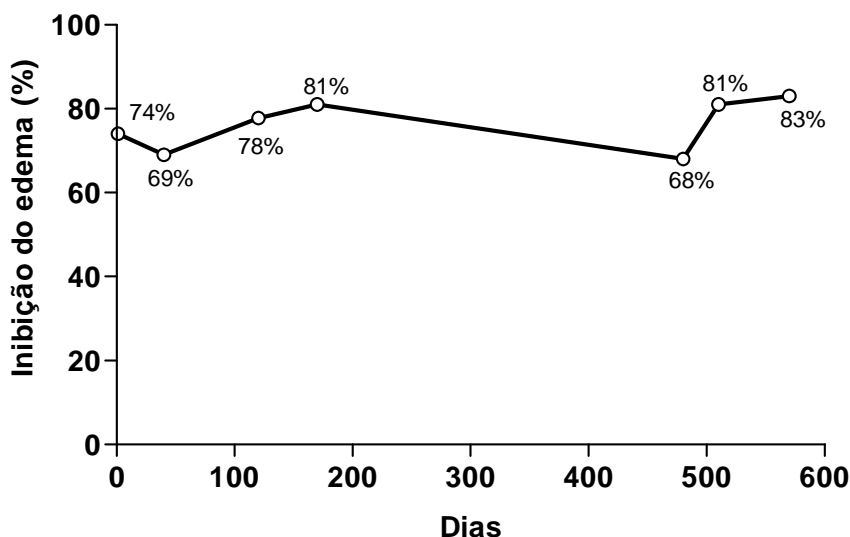


Figura 27: Efeito do EEVS no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA no decorrer do tempo. Os animais foram desafiados com TPA (2,5 µg/orelha, via tópica) e em seguida tratados topicamente com EEVS (1 mg/orelha). A espessura da orelha foi avaliada após 6 horas e os valores da inibição do edema de orelha (%) foram determinados em diferentes tempos, durante o período de 570 dias. Os valores representam a inibição do edema obtida a partir de grupos de 4-6 animais.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Vários estudos com algumas espécies do gênero *Vernonia* têm demonstrado que algumas destas espécies apresentam atividade antiinflamatória e imunomoduladora (KOS et al., 2006; NERGARD et al., 2004; MAZUNDER et al., 2003; IWALEWA et al., 2003). O gênero *Vernonia* produz metabólitos típicos da família Astearacea, como as lactonas sesquiterpênicas (LS), com várias atividades biológicas já descritas, tal como atividade fungistática (KRISHNA-KUMARI et al., 2003), atividade citotóxica (KUO et al, 2003; PAGNO et al., 2006), atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (KOS et al, 2006; IWALEWA, et al, 2003; MAZUNDER et al, 2003). No entanto, nenhum estudo avaliou o potencial antiinflamatório tópico de nenhuma espécie desse gênero, incluindo a *V. scorpioides* que é utilizada topicamente pela população para tratar uma variedade de afecções cutâneas (MORAES, 1997; CABREIRA, 1980). Assim, a investigação da atividade antiinflamatória tópica da *V. scorpioides* se faz necessária para comprovação da eficácia desta espécie nas doenças inflamatórias cutâneas, considerando que o uso tradicional não é suficiente para validar eticamente nenhuma planta medicinal como um medicamento eficaz e seguro (LAPA et al, 2004). Além disso, a interação dos estudos químico/farmacológicos realizados em laboratórios com as informações provenientes da abordagem etnofarmacológica junto às comunidades locais que fazem uso da flora medicinal, resulta numa estratégia bastante útil na investigação de novos fármacos a partir de plantas medicinais. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antiinflamatória tópica da *V. scorpioides* em processos inflamatórios agudos e crônicos, utilizando para tal diferentes modelos experimentais de inflamação cutânea.

O processo inflamatório caracteriza-se por quatro sinais clássicos: calor, eritema, edema e dor. Assim, a utilização do edema como parâmetro de avaliação em modelos validados, como o modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos, permite avaliar o potencial antiinflamatório tanto por via tópica quanto sistêmica de vários agentes, sejam eles compostos sintéticos, extratos de plantas ou compostos isolados (GÁBOR, 2000; DE YOUNG et al., 1989). Além disso, quando o objetivo é o desenvolvimento de medicamentos de uso tópico, esse modelo oferece

ainda a vantagem de identificar compostos que apresentam uma absorção cutânea apropriada de forma a atingir concentrações adequadas na pele para exercer um efeito farmacológico (BOUCLIER et al., 1990).

Os agentes flogísticos utilizados nos experimentos do presente trabalho apresentam ação tópica e induzem uma inflamação local como resultado da produção de mediadores pró-inflamatórios que promovem a vasodilatação, infiltração de células PMN e extravasamento de plasma, conduzindo assim à instalação dos sinais clássicos da inflamação (DE BERNARDIS et al, 1994; FURSTENBERGER et al., 1994). Assim, os modelos de inflamação cutânea permitem identificar compostos com atividade antiinflamatória que possam ser potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele, pois promovem condições que se assemelham com alguns tipos de dermatites observadas em humanos (VANE, 2000; BOUCLIER et al., 1990; CARLSON et al, 1985).

O modelo de edema de orelha induzido por TPA consiste num modelo útil para a triagem da atividade antiinflamatória de compostos que atuam na fase aguda da inflamação, bem como em processos inflamatórios hiperproliferativos (GÁBOR, 2000; MARKS, 1990). A aplicação tópica do TPA induz uma resposta inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema já nas primeiras duas horas, seguido do aumento da espessura da orelha como resultado do extravasamento celular que atinge um pico máximo na sexta hora e tende a diminuir, atingindo os valores basais após 24 horas. A aderência dos leucócitos PMN na parede dos vasos e a degranulação de mastócitos é verificada entre a 4^o e 6^o hora. No entanto, a infiltração máxima de leucócitos polimorfonucleares no tecido é atingida somente 24 horas após a aplicação tópica do TPA (YOUNG et al., 1983). O mecanismo preciso pelo qual o TPA exerce seu efeito é decorrente da ativação da PKC, bem como da ativação seqüencial da via da MAP quinase, fosfolipase A₂, indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que por sua vez culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do TPA (MURAKAWA et al.,

2006; DE BERNARDIS et al, 1994). A ativação da via da MAPK pela PKC, promove a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B e a AP-1, os quais têm um papel central na regulação da produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, tais como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (PASCUAL e GLASS, 2006; GLASS e OGAWA, 2006; GARCIA-PIÑERES et al., 2001; SANCHEZ & MORENO, 1999). Enquanto a fosforilação da PLA₂ pela PKC resulta na liberação do AA seguida da produção de PG e LT via COX e LOX, respectivamente (WANG et al, 2001; YOUNG et al, 1984).

O aumento dos níveis teciduais dos metabólitos do AA, principalmente a PGE₂ e o LTB₄ parece ser determinante para que o processo inflamatório se inicie após aplicação do TPA (MURAKAWA et al, 2006). Também nesse sentido, Nakamura et al. (2003) sugerem que os metabólitos do AA produzidos via 5-LOX são moléculas fundamentais para a formação do edema e infiltração leucocitária nesse modelo, considerando que a PGE₂ contribui no aumento do fluxo sangüíneo através de sua ação vasodilatadora, enquanto os produtos via LOX (LT) são necessários para o extravasamento plasmático e conseqüente formação do edema e infiltração leucocitária (YOUNG et al, 1984). Evidências mais recentes demonstram que a resposta inflamatória do tipo persistente, característica nesse modelo, decorre da produção seqüencial de mediadores inflamatórios como os eicosanóides e citocinas, onde a PGE₂ e o TNF α seriam os principais mediadores edematogênicos (MURAKAWA et al, 2006). Porém, é certo que os metabólitos do AA são os principais mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pelo TPA. Assim, compostos capazes de inibir a cascata do AA se mostram ativos no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA, como efetivamente demonstrado pelos corticóides, inibidores da PLA₂ e inibidores da COX e/ou LOX (GÁBOR, 2000). Da mesma forma que esses agentes antiinflamatórios, a aplicação tópica do EEVS, bem como das frações provenientes desse extrato e do composto isolado luteolina, também preveniram de forma significativa a formação do edema após a indução do processo inflamatório pelo TPA. Além disso, a ação antiedematogênica do EEVS apresentou eficácia comparável ao corticóide dexametasona e ao inibidor não-seletivo da COX indometacina.

Ao contrário da administração tópica, a administração do EEVS por via oral não promoveu nenhum efeito sobre a inibição do edema induzido por TPA, confirmando assim o uso tradicional da *V. scorpioides* por via tópica nas afecções cutâneas. Da mesma forma, alguns agentes antiinflamatórios não-esteroidais, incluindo a indometacina, aspirina e piroxicam, demonstraram ser efetivos na inibição do edema induzido por TPA quando administrados topicamente, porém não apresentaram nenhum efeito quando administrados por via oral (CARLSON et al., 1985). Esse resultado pode ser justificado, considerando que a administração tópica direta no sítio de inflamação permite que uma maior concentração dos compostos responsáveis pela atividade antiinflamatória seja alcançada no local (GÁBOR, 2000). Assim, parece que a via de administração é de fundamental importância para se obter uma atividade antiinflamatória efetiva na pele.

O modelo de edema de orelha induzido pelo TPA também permite avaliar outros parâmetros inflamatórios importantes envolvidos em muitas doenças cutâneas, como por exemplo, a infiltração leucocitária no tecido lesado durante uma resposta inflamatória aguda (WINYARD, 2003; GÁBOR, 2000). Os neutrófilos são os primeiros tipos celulares a migrarem para a região exposta a um estímulo nocivo. Esse processo envolve uma interação complexa dos leucócitos com o endotélio através da expressão de moléculas de adesão de superfície (selectinas, ICAM – molécula de adesão intercelular, e integrinas) sendo também facilitado pela ação de agentes quimiotáticos, como a IL-8, C5a e LTB4 (RANG et al, 2007; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; ARNHOLD, 2003). Uma vez no local inflamado, os neutrófilos liberam uma variedade de substâncias, tais como ROS, mediadores pró-inflamatórios e enzimas proteolíticas, como a MPO, contribuindo de forma significativa na manutenção do processo inflamatório (BRADLEY et al., 1982).

A aplicação tópica do TPA resulta no aumento gradual dos níveis da enzima MPO, de forma que a avaliação da atividade desta enzima é utilizada como indicativo da presença de leucócitos PMN no tecido inflamado, pois estudos demonstraram uma forte correlação entre atividade da MPO e número de neutrófilos no tecido (BRADLEY et al, 1982). A inibição da atividade da MPO promovida pela administração de um composto

pode ser decorrente da redução do recrutamento de neutrófilos no tecido inflamado, da inibição direta desta enzima ou ainda da redução da disponibilidade de seu substrato (H_2O_2) (ARNHOLD, 2003). O EEVS e as frações Ace e DCM, promoveram uma inibição marcante da atividade da MPO, sugerindo que pode estar ocorrendo diminuição no número de neutrófilos infiltrados no tecido. Essa possibilidade foi confirmada através da análise histológica e da avaliação da atividade *in vitro* do EEVS sobre a MPO. De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que o EEVS atua especificamente na inibição da infiltração leucocitária no tecido cutâneo e não exerce nenhum efeito inibitório direto sobre a atividade da enzima MPO, pelo menos nas concentrações testadas. A infiltração leucocitária também se revelou diminuída quando os camundongos foram submetidos ao tratamento com o extrato hidroalcoólico da *V. scorpioides* (via oral) no modelo de peritonite induzido por carragenina (DREUX, 2005), corroborando assim com os resultados obtidos no presente trabalho.

O acúmulo de neutrófilos e de leucócitos mononucleares no tecido cutâneo é uma característica comum no modelo de edema de orelha induzido por TPA e está relacionado com o aumento dos níveis de eicosanóides e da expressão da COX-2 (GÁBOR, 2000; SANCHEZ e MORENO, 1999). Assim, segundo Sanchez e Moreno (1999), compostos que inibem o influxo de leucócitos no tecido também suprimem a formação do edema e promovem a redução dos níveis de eicosanóides na área inflamada. O fato do EEVS inibir a migração de neutrófilos é de grande importância, tendo em vista que o aumento do número de neutrófilos na pele tem grande relação com algumas doenças inflamatórias cutâneas como algumas dermatites e psoríase (RANG et al, 2007; SCHAERLI et al., 2004). Diante dos resultados obtidos, a *V. scorpioides* se mostra uma planta em potencial para o tratamento de afecções inflamatórias cutâneas, considerando que esta é capaz de atuar de forma efetiva sobre dois eventos importantes associados ao processo inflamatório, como o edema e a infiltração de PMN.

Da mesma forma, as frações Ace e DCM obtidas a partir do EEVS também foram efetivas na redução da formação do edema de orelha induzido pelo TPA, bem como na inibição da atividade da MPO, demonstrando assim um efeito antiinflamatório dos

compostos presentes nessas frações. No entanto, estudos conduzidos por Pagno et al. (2006) demonstraram que a fração DCM da *V. scorpoides* promove um aumento do influxo de neutrófilos na cavidade peritoneal, quando administrada por via intraperitoneal, no modelo de tumor ascítico de Erlich.

As LS, metabólitos típicos da família Astearacea, foram isoladas a partir da fração DCM do extrato etanólico da *V. scorpoides*, especificamente LS da classe dos hirsutinólídeos e glaucolídeos (BUSKÜHL, 2007; PAGNO et al., 2006). Vários estudos já demonstraram a capacidade das LS promoverem a inibição da formação do edema induzido por diferentes agentes flogísticos (adjuvante de Freund, TPA, formalina e carragenina) em diversos modelos de inflamação, como no modelo de edema de orelha em camundongos e edema de pata em ratos (VALÉRIO et al., 2007; RECIO, 2000; HALL et al., 1980; HALL et al., 1979).

O mecanismo de ação no qual várias LS promovem seu efeito antiinflamatório envolve a inativação do fator de transcrição NF- κ B, suprimindo assim a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, como demonstrado pela helenalina, uma LS protótipo com atividade antiinflamatória (MERFORT, 2003; PAHL, 1999; RÜNGELER et al., 1999). LS isoladas de plantas usadas tradicionalmente como antiinflamatórios, incluindo a *Milleria quinqueflora*, *Vanillomopsis arborea*, *Mikania guaco* e *Mikania cardifolia*, demonstraram diminuir a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além da proliferação de linfócitos, reforçando as evidências de que o efeito antiinflamatório e imunossupressor das LS envolvem o fator de transcrição NF- κ B (KOCH et al., 2001). A inibição do NF- κ B pelas LS decorre da alquilação de nucleófilos biológicos por uma reação tipo adição de Michael, sendo o alvo primário os resíduos de Cys³⁸ e Cys¹²⁰ (cisteína) presentes no domínio de ligação no DNA do fator de transcrição NF- κ B (subunidade P65). A alquilação de ambos os resíduos de cisteína pela LS torna impossível a interação da subunidade p65 com o resíduo de Tyr³⁶ (tirosina) do DNA e assim a transcrição gênica de várias proteínas pró-inflamatórias (RÜNGELER et al., 1999; KOCH et al., 2001; GARCIA-PINERES et al., 2001). A transcrição gênica de algumas citocinas quimiotáticas como a IL-8 e a da MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos) são reguladas pelo fator de transcrição NF-

κ B e algumas LS já demonstraram bloquear a produção destas citocinas de maneira dose-dependente em células epiteliais (GRASSI et al., 2005). Da mesma forma, Kos et al. (2006) demonstraram a capacidade de duas LS da classe dos hirsutinólídeos, isoladas da espécie *Vernonia tifflosculosa*, promoverem a inibição da produção de IL-8 em estudos *in vitro*. Assim, a atividade do EEVS e da fração DCM sobre a infiltração de neutrófilos poderia estar associada com a inibição da síntese desta potente citocina quimiotática via inativação do NF- κ B, o que torna a IL-8 um alvo interessante na pesquisa de antiinflamatórios e as LS promissoras na intervenção terapêutica da inflamação. Além disso, a ação das LS presentes na *V. scorpioides* sobre o NF- κ B também explicaria o efeito antiedematogênico desta planta por inibição da expressão de outras proteínas pró-inflamatórias chaves no processo inflamatório.

Considerando as vias e os mediadores pró-inflamatórios envolvidos na resposta inflamatória no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA, verifica-se que vários são os alvos sobre os quais os compostos presentes na *V. scorpioides* podem exercer sua ação farmacológica. No entanto, parte da ação antiinflamatória dessa planta também poderia ser decorrente de um efeito inibitório sobre a síntese de metabólitos do AA ou bloqueando suas ações. Isso porque dados da literatura sugerem que compostos como corticóides, inibidores da COX ou 5-LOX e antagonistas do LTB₄ também são ativos nesse modelo (MURAKAWA et al., 2006; PARK et al., 2001; CARLSON et al., 1985). Estudos *in vitro* e *in vivo* também demonstram que alguns compostos antioxidantes presentes em plantas, como os flavonóides, apresentam atividade antiinflamatória marcante, o que tem despertado grande interesse na investigação destes compostos como agentes antiinflamatórios (HERNANDEZ et al., 2007; CALIXTO et al., 2003).

A principal propriedade atribuída aos flavonóides é a atividade antioxidante, sendo essa atividade decorrente da capacidade desses compostos atuarem como seqüestradores de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (SADIK et al., 2003). Além da propriedade antioxidante, vários estudos também demonstraram a ação dos flavonóides sobre os estágios iniciais do processo inflamatório, como a inibição da

infiltração de leucócitos e diminuição da permeabilidade capilar (ALCARAZ e CARVALHO, 2004).

O EEVS também inclui algumas flavonas em sua composição fitoquímica, como a luteolina e apigenina. Este grupo de flavonóides demonstraram inibir a produção de alguns mediadores inflamatórios como a PGE₂ e o NO via diminuição da expressão da COX-2 e iNOS (KIM et al., 1999). Além disso, a luteolina também promove a inibição da produção de TNF α , além de ser um potente inibidor da PKC e da ativação de mastócitos, o que explica o efeito antialérgico desse flavonóide (CALIXTO et al, 2003; UEDA et al., 2002). Zheng et al. (2005) sugerem que os flavonóides luteolina e apigenina exercem seus efeitos antiinflamatórios por inibição da atividade da enzima LOX, em consequência de uma ação antioxidante, uma vez que a 5-LOX converte o AA em leucotrienos através de uma reação de oxidação (lipoxigenação). Assim, muitos compostos antioxidantes são também caracterizados como inibidores da 5-LOX (BUCKLE e HEDGECOCK, 1997).

Diante dessas evidências, supõe-se que a atividade antiinflamatória do EEVS poderia também estar parcialmente associada com a presença de flavonóides, como a luteolina, uma vez que este flavonóide também demonstrou uma atividade anti-edematogênica, porém não superior ao EEVS no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA, sugerindo assim um efeito aditivo ou sinérgico de mais de um composto presente no EEVS.

Nas doenças inflamatórias, os níveis de ROS estão consideravelmente aumentados, contribuindo para o dano tecidual e a exacerbação do processo inflamatório (PÉREZ-GARCIA, 1996). Nesse contexto, teve-se por objetivo a avaliação da atividade antioxidante do EEVS através da determinação indireta da formação de ROS, onde foi demonstrada pela primeira vez a atividade antioxidante do EEVS e confirmou a atividade antioxidante do composto isolado luteolina no modelo do TPA. A capacidade do EEVS em reduzir os níveis teciduais de ROS se mostrou mais efetiva que a do ácido α -lipóico, um potente agente antioxidante que atua como seqüestrador de radicais livres, quelante de íons metálicos e regenerador de antioxidantes endógenos e exógenos, como a ubiquinona, glutathiona e ácido ascórbico (HO et al.,

2007). No entanto, também é importante considerar que a inibição da infiltração de leucócitos na derme promovida pelo EEVS poderia ser o mecanismo dominante na diminuição das ROS, uma vez que os neutrófilos quando ativados são responsáveis por uma produção bastante intensa destas espécies reativas (NAKAMURA et al, 2003).

As ROS produzidas por via endógena ou exógena tendem a causar um dano oxidativo no DNA, bem como a desregulação de vias de sinalização celular que estão envolvidas nos estágios da carcinogênese. A aplicação tópica do TPA na pele de camundongos resulta em alterações bioquímicas, mudanças nas funções celulares e alterações histológicas que podem culminar na promoção de tumor cutâneo (HO et al., 2007), dentre os quais incluem edema, hiperplasia epidérmica, inflamação, proliferação celular e estresse oxidativo (FURSTENBERGER et al, 1983). Essas alterações são consideradas marcadores da promoção de tumor na pele, sendo utilizados na avaliação do potencial quimiopreventivo de agentes contra a tumorigênese (SLAGA, 1984). O fato do EEVS inibir a formação de ROS durante o processo inflamatório, bem como atuar sobre outros parâmetros, aponta para a possibilidade da *V. scorpioides* atuar na prevenção de doenças relacionadas com um desequilíbrio do estado oxi-redutivo em nível celular, como por exemplo o câncer de pele. Assim, seria interessante a investigação da ação quimiopreventiva desta planta em modelos de câncer de pele, pois vários agentes anticarcinogênicos, estruturalmente distintos, inibem o processo inflamatório e a promoção do tumor através da diminuição da produção de ROS (PARK et al., 2003). Além disso, a fração DCM já demonstrou atividade tumoricida sobre o tumor de Erlich e algumas LS demonstraram atividade citotóxica em cultura de células de melanoma (BUSKÜHL, 2007; PAGNO et al., 2006).

Para auxiliar na investigação sobre o mecanismo pelo qual a *V. scorpioides* promove seu efeito antiinflamatório, foram utilizados outros agentes flogísticos que desencadeiam processos inflamatórios agudos por mecanismos distintos, como o ácido araquidônico, fenol, capsaicina, histamina e oxazolona.

A aplicação tópica do AA gera uma resposta inflamatória rápida caracterizada por intenso eritema e edema com pequeno acúmulo de neutrófilos, quando comparado com a migração celular verificada no modelo de TPA, cujos principais mediadores envolvidos

são PGE₂, LTC₄ e LTD₄, (CRUMMEY et al., 1987; HUMES et al., 1986; YOUNG et al., 1983). Porém, Recio et al. (2000) sugerem que o edema induzido pelo AA é preferencialmente um modelo de triagem para identificação de inibidores da LOX. Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINE) inibem a via da COX, impedindo, portanto a síntese das PG (BROOKS e DAY, 1991). Assim, o fármaco de referência utilizado neste modelo experimental foi a indometacina, um AINE cuja ação antiinflamatória está relacionada com a inibição não-seletiva das isoformas da COX (COX-1 e COX-2) e que reverte efetivamente o edema induzido pela aplicação tópica do AA, conforme descrito na literatura (GÁBOR, 2000). Da mesma forma que a indometacina, o EEVS também se mostrou efetivo na inibição da formação do edema neste modelo.

Segundo Carlson e colaboradores (1985), o modelo de edema de orelha induzido por TPA e AA são extremamente úteis na detecção *in vivo* de inibidores da COX/LOX ou 5-LOX. No entanto, os metabólitos do AA também promovem a degranulação de mastócitos, de forma que a liberação de histamina contribui parcialmente na formação do edema neste modelo (CAMP, 1982). Assim, deve-se considerar que o modelo do AA não é específico para a identificação de compostos que inibem exclusivamente a COX e/ou LOX, pois outros agentes como antagonistas da histamina e antioxidantes também reduzem o edema induzido pelo AA (CRUMMEY, 1987). Em geral, os corticóides e as LS não promovem nenhum efeito no modelo do AA, ao passo que os flavonóides se mostram ativos nesse modelo (GÁBOR, 2000; RECIO, 2000). Da mesma forma, estudos demonstram que a atividade da COX-1 não é influenciada por algumas LS e que o modo de ação pelos quais estes compostos atuam não está diretamente relacionado com o metabolismo do AA (LYSS et al., 1997; BORK et al., 1997; HWANG et al., 1996; HALL et al., 1980).

Sendo assim, os resultados obtidos nos modelos de TPA e AA demonstraram a eficácia da *V. scorpioides* nos processos inflamatórios cutâneos agudos, além de fornecerem evidências de que a ação antiinflamatória desta planta provavelmente envolva a redução dos níveis dos metabólitos do AA no tecido cutâneo. A confirmação dessas evidências, através da quantificação de PG e LT presentes no tecido, reafirmaria

a eficácia da *V. scorpioides*, considerando o fato do AA e seus metabólitos estarem implicados na patogênese de várias doenças inflamatórias cutâneas (GÁBOR, 2000).

Outros mediadores, além dos metabólitos do AA, também estão envolvidos na promoção do edema durante a inflamação, como a histamina, serotonina, bradicinina e substância P, que agem diretamente em receptores específicos presentes no endotélio celular e nas vênulas pós-capilares e que também devem ser considerados (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; RECIO et al., 2000). A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenemida), um alcalóide encontrado na espécie *Capsicum annum L.*, quando aplicada topicamente produz uma resposta inflamatória neurogênica imediata, caracterizada por vasodilatação arteriolar, aumento de fluxo sanguíneo e conseqüente formação de edema por extravasamento plasmático, além de sensibilização a dor. Esse efeito provém da estimulação de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro e da liberação de mediadores neurogênicos da inflamação como a histamina, serotonina e de neuropeptídeos, seguido da formação de edema cujo pico máximo é atingido até 30 minutos após a aplicação tópica da capsaicina (ZEGARSKA et al., 2006; SHOLZEN et al, 2003; GÁBOR; 2000; HOLZER, 1991). No entanto, é proposto que o edema induzido pela capsaicina seja primariamente mediado por neuropeptídeos (substância P, CGRP, VIP e neurocinina A) liberados após ativação dos neurônios sensoriais, e estes, por sua vez, estimulam a liberação de histamina e serotonina, sendo estes últimos os mediadores responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular no tecido inflamado (INOUE et al., 1993). O EEVS inibiu a formação do edema, apesar dessa inibição ter sido pouco eficaz. Assim, os compostos presentes no EEVS parecem não agir diretamente nos receptores nos quais a capsaicina promove seu efeito (receptores TRPV1). Alguns estudos demonstram que o edema induzido pela aplicação tópica da capsaicina é inibido por antagonistas da histamina e serotonina, mas não por inibidores da COX, como a indometacina. Por outro lado, assim como a dexametasona (antiinflamatório esteroide), clorfeniramina (bloqueador dos receptores H₁) e metisergida (antagonista de receptores 5-HT), o EEVS promove a redução do edema tanto no modelo da capsaicina, quanto no modelo do AA, porém com eficácias diferentes (GÁBOR, 2000).

Para uma melhor caracterização das propriedades farmacológicas da *V. scorpioides* foi avaliado o efeito do EEVS sobre outros modelos de inflamação cutânea como o modelo de edema de orelha induzido pelo fenol, histamina e pela oxazolona, que mimetizam a dermatite de contato irritativa, reações alérgicas do tipo imediata e a dermatite de contato alérgica (hipersensibilidade do tipo tardia), respectivamente.

O fato do EEVS inibir o edema induzido por um agente irritante como o fenol demonstra a possível eficácia desse extrato no tratamento da dermatite de contato frente a agentes irritantes. Em resposta a estímulos exógenos, como o fenol, os queratinócitos produzem mediadores químicos importantes na irritação primária de contato, incluindo citocinas associadas a propriedades pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , TNF- α e IL-8 (LIM et al., 2004; WILMER et al., 1994). Um dos mecanismos pelos quais o fenol promove a irritação cutânea seria a ruptura da membrana plasmática dos queratinócitos por efeito direto, resultando na liberação da IL-1 α pré-formada, além de outros mediadores inflamatórios como os metabólitos do AA e ROS. As citocinas pró-inflamatórias são induzidas nesse modelo por um mecanismo distinto daquele observado no modelo de inflamação cutânea induzido pelo TPA, onde a indução das citocinas ocorre via ligação a receptores específicos, através de vias dependentes da PKC, nas quais envolvem fatores de transcrição nuclear (WILMER et al., 1994). No entanto, apesar da resposta inflamatória ser desencadeada por diferentes vias, ambos os modelos compartilham do envolvimento dos metabólitos do AA e ROS na resposta inflamatória instalada. Assim, esses dados sugerem que o EEVS pode estar exercendo sua ação antiinflamatória por atuar sobre esses mediadores, como eficientemente demonstrado nos modelos do AA e TPA, e pela sua ação antioxidante.

Os mastócitos desencadeiam reações imediatas do tipo alérgica em resposta a diversos alérgenos, através da interação dos seus receptores de superfície com a IgE, conduzindo a degranulação e liberação de diversos mediadores vasoativos, pró-inflamatórios e nociceptivos, como a histamina, citocinas (IL-6, IL-8, IL-13), prostaglandinas (PGD₂), leucotrienos (LTC₂), TNF- α e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (THEOHARIS et al., 2007). A histamina causa vasodilatação e um aumento na permeabilidade vascular, promovendo uma resposta edematogênica

em poucos minutos (BRAND et al., 2002). Além dessas ações, a histamina ainda estimula fibras nervosas sensitivas através de mecanismos H1-dependentes que resulta em prurido. Uma das principais funções fisiopatológicas da histamina é a sua ação como mediador das reações de hipersensibilidade do tipo I, como a urticária (RANG et al, 2007; BRAND et al., 2002).

A reação de hipersensibilidade imediata desenvolve-se após a degranulação dos mastócitos e liberação da histamina. A aplicação tópica prévia do EEVS promoveu a inibição do edema induzido pela histamina. Da mesma forma, o composto sesquiterpênico α -humuleno, extraído do óleo essencial da *Cordia verbanacea* e que também está presente no óleo essencial da *V. scorpioides*, foi capaz de diminuir a formação do edema de pata induzido pela injeção intraplantar da histamina em camundongos (FERNANDES et al., 2007). Apesar do EEVS ter apresentado um efeito antiedematogênico moderado na resposta inflamatória cutânea da histamina quando comparado com os resultados obtidos no modelo do TPA, AA e fenol, este extrato poderia ainda ser útil no alívio de alguns sintomas da hipersensibilidade imediata, como o prurido presente em algumas situações como picadas de insetos, re-exposição de contato com alérgenos, como por exemplo, alguns oriundos de plantas ou até mesmo o níquel. No entanto, para tal indicação ainda é necessário a realização de experimentos que confirmem sua atividade anti-pruriginosa.

A dermatite de contato alérgica pode ser induzida por vários alérgenos e alguns destes são utilizados como ferramentas farmacológicas experimentais, como a oxazolona e o dinitrofluorobenzeno (DNFB). O modelo de edema de orelha induzido pela oxazolona mimetiza a reação de hipersensibilidade de contato do tipo tardia (dermatite de contato), caracterizada por uma resposta imunológica mediada por células, acompanhada de infiltração celular e liberação de diversas citocinas (RANG et al, 2007; ABBAS e LICHTMAN, 2005). Duas fases dissociadas temporo-espacialmente são necessárias para atingir uma reação de hipersensibilidade máxima: a fase de sensibilização e a fase efetora. A fase de sensibilização ocorre no primeiro contato da pele com a oxazolona e é a fase responsável pela expansão das células T no linfonodo. A oxazolona aplicada topicamente penetra na epiderme onde é captada pelas células

apresentadoras de antígenos (células de langerhans), que migram para os linfonodos de drenagem e apresentam as moléculas de MHC associadas à oxazolona aos precursores de células T específicas (linfócitos T CD₄ e CD₈ imaturas), onde estas são ativadas e expandem-se no linfonodo sob influência da IL-12, sendo a partir desse momento designadas de células T “sensibilizadas” (RANG et al, 2007; TUCKERMANN et al, 2007; HENNINO et al., 2005). A fase efetora ocorre após o contato subsequente com a oxazolona, que induz a produção de quimiocinas, ativação de células endoteliais e de mastócitos, que resultam na ativação da microvasculatura, permitindo a infiltração dos leucócitos nas primeiras 2 horas. Em resposta a algumas citocinas, os linfócitos T sensibilizados migram para a derme e são re-estimulados pelas células de langerhans residentes, onde passam a secretar mediadores pro-inflamatórios que promovem uma segunda infiltração maciça de leucócitos (TUCKERMANN et al, 2007; HENNINO et al., 2005). Algumas citocinas secretadas pelos linfócitos T ativados tais como a IL-2, TNF-β e IFNγ promovem a ativação dos macrófagos e estes, por sua vez, estimulam a inflamação aguda por meio da secreção de outras citocinas, principalmente TNF-α e IL-1, quimiocinas, PG e LT (ABBAS e LICHTMAN, 2005; DEBENEDICTS et al., 2001). Assim, a sensibilização dos camundongos com a aplicação repetida da oxazolona produz uma hipersensibilização por contato caracterizada por extravasamento plasmático (edema), hiperplasia epidérmica intensa, infiltração de células inflamatórias como monócitos, granulócitos e macrófagos, além do aumento da população de linfócitos T (CD₈⁺) nos linfonodos (SHIN, 2005; FUJII et al., 2002; WANG et al., 2000).

Os animais submetidos ao tratamento com o EEVS em ambas as fases de exposição a oxazolona apresentaram uma redução dos parâmetros inflamatórios avaliados, como o edema e a infiltração de leucócitos, bem como o tratamento do EEVS somente na fase efetora também se mostrou efetivo em relação a formação do edema. No entanto, o tratamento dos animais somente na fase de sensibilização com o EEVS, assim como a dexametasona, não reverteu o processo inflamatório que é desencadeado na fase efetora, bem como não reduziu o número de linfócitos T CD₄ e CD₈, demonstrando que o EEVS não apresenta uma ação imunossupressora, provavelmente por não alterar a produção ou as ações de citocinas essenciais envolvidas no processo de apresentação

de antígenos, bem como na expansão e diferenciação dos linfócitos T. Os resultados obtidos pelo tratamento do EEVS nesse modelo se assemelham com a ação dos corticóides, onde Tuckermann et al. (2007) assumem que a fase efetora é responsiva ao tratamento com os glicocorticóides, pois o tratamento nessa fase preveniu efetivamente a resposta inflamatória, enquanto estes agentes não alteraram essa resposta na fase de sensibilização no modelo de hipersensibilidade de contato. É provável que o EEVS promove um efeito essencialmente antiinflamatório nesse modelo via supressão de citocinas, quimiocinas, expressão de moléculas de adesão ou outros mediadores envolvidos na resposta inflamatória desencadeada após a fase efetora. A ação coletiva destes mediadores na resposta imune mediada por células promove uma inflamação local com uma infiltração intensa de neutrófilos (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Assim, a redução da infiltração de neutrófilos por ação do EEVS pode estar diretamente relacionada com a reversão da resposta inflamatória verificada, pois os neutrófilos ativados presentes no foco inflamatório contribuem significativamente na liberação de alguns mediadores inflamatórios (LT, PG e elastase humana leucocitária) tanto nas doenças essencialmente inflamatórias como nas reações de hipersensibilidade cutânea. O bloqueio das enzimas responsáveis pela síntese de alguns mediadores inflamatórios também explica a atividade antiinflamatória dos extratos de muitas plantas que são utilizadas na medicina popular com a finalidade de tratar doenças inflamatórias cutâneas (PRIETO et al., 2003). No entanto, apesar dos níveis das PG e LT se apresentarem aumentados após a fase efetora, demonstrando assim o envolvimento desses mediadores na resposta inflamatória desencadeada nesse modelo, inibidores seletivos das enzimas COX e 5-LOX não o revertem, ao contrário dos corticóides que suprimem o edema e reduzem os níveis desses mediadores lipídicos (BAS et al., 2006; MEURER et al., 1988). De qualquer forma, diante dos resultados obtidos, o EEVS demonstra que também é capaz de inibir a resposta inflamatória (efetora) mediada pelo sistema imune, como as dermatites alérgicas observadas em humanos, e não somente inibir a resposta inflamatória por irritação imediata, como verificado nos modelos inflamação aguda (FUJII et al., 2002).

A ação do EEVS sobre processos inflamatórios cutâneos crônicos foi avaliada através do modelo de aplicação múltipla do óleo de cróton. Segundo Stanley et al. (1991), este consiste num modelo mais relevante para avaliação de compostos antiinflamatórios do que o modelo de TPA agudo, considerando que a forma de tratamento dos compostos a serem testados se assemelha ao tratamento clínico usual dos medicamentos antiinflamatórios, que é justamente a sua utilização após o estabelecimento do processo inflamatório. Assim, este modelo permite avaliar a atividade de compostos capazes de promover a resolução de um processo inflamatório crônico (ALFORD et al., 1992). Como discutido anteriormente, ésteres de forbol presentes no óleo de cróton, como o TPA, ativam a PKC, aumentam a permeabilidade vascular, induzem a síntese de metabólitos do AA e induzem a expressão da COX-2, IL-1 β , TNF- α e da molécula de adesão ICAM-1 (CHI et al, 2003; GUPTA et al., 1989; DE YOUNG et al., 1989). A aplicação múltipla do óleo de cróton promove uma reação inflamatória persistente acompanhada do aumento do peso das orelhas, intensa migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (CD₄⁺ e CD₈⁺) e hiperproliferação epidérmica (acantose), aproximando este modelo das características presentes em algumas doenças inflamatórias crônicas da pele (STANLEY et al., 1991). Antiinflamatórios esteroidais (corticóides) e inibidores da LOX são ativos nesse modelo, enquanto os inibidores da COX, como a indometacina, se mostram inativos (GREEN e SHUSTER, 1987). Da mesma forma que os corticóides, a aplicação tópica do EEVS foi capaz de suprimir o edema quando o processo inflamatório já estava instalado, sendo que esse efeito foi confirmado na análise histológica através da verificação da espessura total da pele e da redução na formação de acantoses.

A inflamação aguda é uma resposta rápida frente a diversos agentes ou estímulos que envolvem o recrutamento e ativação de neutrófilos. No entanto, quando o estímulo não é eliminado o processo inflamatório persiste, tornando-se crônico. A principal característica da transição do processo inflamatório agudo para crônico é a mudança na composição do infiltrado leucocitário, onde os neutrófilos são substituídos por células mononucleares fagocíticas e linfócitos T (POBER e SESA, 2007). Alford et al. (1992) demonstraram no modelo de aplicação múltipla do TPA que a mudança do perfil

leucocitário ocorre a partir do décimo dia, onde ocorre um declínio do número de PMN e a prevalência de mononucleares. A redução da migração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos para o sítio de inflamação por um determinado composto é importante na reversão do processo inflamatório crônico. A aplicação tópica do EEVS demonstrou exercer seu efeito sobre a migração de PMN nesse modelo de inflamação crônica da pele, assim como na resposta inflamatória aguda. Porém, ao contrário da dexametasona, esse efeito não foi reproduzido em relação aos leucócitos mononucleares, baseando-se no estudo da atividade da NAG. A NAG é uma enzima lisossômica produzida por monócitos ativados (macrófagos) e é utilizada como um indicador da infiltração de dessas células nos sítios inflamatórios (BAILEY, 1988). Ainda que os PMN não sejam os principais tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória crônica, a redução do número dos PMN no tecido promovido pelo tratamento com o EEVS pode contribuir na resolução da resposta inflamatória, considerando que os neutrófilos liberam radicais livres, mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas (ARNHOLD, 2003; BRADLEY et al., 1982). Em certas afecções cutâneas crônicas, como na psoríase, existe uma infiltração marcante de neutrófilos. Os mediadores liberados pelos neutrófilos são responsáveis pela sustentação de um processo inflamatório agudo na placa psoriática, através da ativação de queratinócitos e linfócitos T (TERUI, 2000). Nesse contexto, a investigação da ação do EEVS nesse tipo de condição cutânea seria de grande interesse.

A quantificação dos leucócitos totais presentes no tecido das orelhas tratadas cronicamente mostrou que ocorre uma redução semelhante destas células nos grupos tratados com o EEVS e dexametasona. Esse resultado estaria em desacordo com os resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da MPO e NAG, onde a diferença observada entre os grupos foi mais pronunciada. Assim, era esperada uma redução mais intensa no número de leucócitos infiltrados do grupo tratado com a dexametasona, considerando que um dos mecanismos de ação dos corticóides envolve a regulação negativa de genes de múltiplas proteínas inflamatórias, como citocinas quimiotáticas e moléculas de adesão (SCHIMMER e PARKER, 2006; BARNES, 1998). No entanto, Alford et al. (1992) demonstraram que o glicocorticóide hidrocortisona afeta

de modo diferente os tipos celulares presentes no tecido, de forma que no modelo de inflamação crônica induzida pela aplicação múltipla de TPA em orelhas de camundongos, o número de PMN e linfócitos T foram significativamente reduzidos pela ação tópica da hidrocortisona, enquanto o número de macrófagos não foi alterado por esse tratamento. Essas evidências tornam os achados desse trabalho consistentes, pois o EEVS inibe a migração dos neutrófilos, enquanto a dexametasona inibiu preferencialmente a migração de neutrófilos em relação aos macrófagos. Assim, o balanço final de leucócitos presentes na derme não seria tão pronunciado entre os grupos tratados com o EEVS e com a dexametasona, conforme verificado nos resultados obtidos.

O tratamento com o óleo de cróton na pele de camundongos resulta numa resposta pleiotrópica envolvendo, além da formação do edema e de uma intensa infiltração leucocitária, a alteração do crescimento e diferenciação dos queratinócitos. A resposta hiperproliferativa nesse modelo assemelha-se com algumas doenças de pele como a psoríase (GÁBOR, 2000). A análise histológica demonstrou que o tratamento repetido com o EEVS inibe de forma efetiva a hiperproliferação epidérmica, como demonstrada pela ausência de acantose. Os níveis da IL-1 β e TNF- α , além da expressão da COX-2, estão consideravelmente aumentados na inflamação crônica induzida pela aplicação múltipla de TPA em orelha de camundongos (CHI et al, 2003; GUPTA et al., 1989). As citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α promovem o aumento da expressão do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) nos fibroblastos. Esses fatores de crescimento, nomeadamente o KGF-1 e KGF-2, quando secretados pelos fibroblastos estimulam a proliferação e diferenciação dos queratinócitos (BROUGHTON et al, 2006). A síntese de PGE₂ na epiderme também está envolvida no processo de hiperproliferação epidérmica e este processo pode ser prevenido por inibidores da COX, como a indometacina (SCHOLZ et al, 1995). Além disso, a inibição da síntese de algumas citocinas, como a IL-1 e dos metabólitos do AA, são alguns dos mecanismos pelos quais os glicocorticóides exercem seus efeitos antiinflamatórios (TOWBIN et al., 1995). Os compostos presentes no EEVS também podem estar atuando através de mecanismos semelhantes, como por exemplo, LS que já tem sua atividade sobre a inibição do NF-

kB. A inibição desse fator de transcrição pelas LS presentes no EEVS poderia promover a diminuição da expressão de vários mediadores inflamatórios, entre eles a IL-1 e a enzima COX-2, resultando na reversão da acantose, edema e infiltração leucocitária. O tratamento com substâncias antioxidantes também foi capaz de reduzir a citopatologia da pele psoriática, provavelmente por inibição da síntese de LT. Além disso, o efeito do uso tópico do inibidor da 5-LOX lonapaleno, em nível clínico, se mostrou efetivo na resposta inflamatória presente na psoríase, provavelmente por inibição da síntese do LTB₄ (BLACK et al., 1990; LASSUS e FORSSTROM, 1985). Assim, a efetividade do EEVS nesse modelo poderia também ser resultado da sua ação sobre a síntese dos metabólitos do AA, considerando que a PGE₂ e LTB₄ são mediadores relevantes da patologia dos processos inflamatórios hiperproliferativos.

A avaliação da estabilidade do extrato de uma planta na qual a atividade farmacológica está sendo investigada é de extrema importância, pois existe a necessidade de garantir a confiabilidade dos resultados gerados bem como identificar plantas que possuam compostos com atividade farmacológica que se degradam facilmente, o que limitaria o seu desenvolvimento como produto. A estabilidade do EEVS se manteve durante o período em que foram realizados os experimentos, uma vez que a atividade antiedematogênica desse extrato permaneceu constante, demonstrando que os compostos responsáveis por tal atividade não se degradaram nas condições no qual o EEVS foi armazenado.

Da mesma forma que algumas plantas são amplamente utilizadas na indústria cosmética, devido as suas propriedades antiinflamatórias e/ou antioxidantes, tais como a *Carapa guianensis* (Andiroba), *Camellia sinensis* (Chá verde), *Glycyrrhiza glabra* (Alcaçuz), *Matricaria recutita* (Camomila), *Calendula officinalis* (Calêndula), etc (DATTNER, 2004), os resultados obtidos nesse trabalho também tornam a *V. scorpioides* uma planta interessante a ser utilizada no desenvolvimento de formulações dermocosméticas destinadas ao tratamento de diversas condições dermatológicas. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo de ação pelo qual essa planta exerce seus efeitos, bem como estudos que comprovem a segurança do seu uso tópico em humanos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados observados no presente trabalho demonstraram que:

- O EEVS, diferentes frações e o composto isolado luteolina apresentaram atividade antiedematogênica no modelo de inflamação cutânea aguda induzida pelo TPA, sugerindo que o EEVS possui mais de um composto responsável por tal atividade quando administrado topicamente;
- O EEVS não apresentou ação antiedematogênica quando administrado por via oral, sugerindo uma melhor ação quando aplicado topicamente;
- O EEVS e a luteolina foram capazes de reduzir a formação das ROS no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA, demonstrando uma possível ação antioxidante desse extrato que contribui para sua ação antiinflamatória;
- O EEVS e fração DCM inibiram a atividade da MPO no modelo de edema de orelha, indicando a presença de um ou mais compostos capazes de atuar sobre a migração leucocitária;
- A formação do edema de orelha induzido pelo AA foi inibida pelo EEVS, indicando que o mecanismo de ação pelo qual o EEVS promove seu efeito antiedematogênico possivelmente envolva a redução dos níveis dos metabólitos do AA no foco inflamatório;
- O EEVS promove uma inibição moderada do edema presente na inflamação neurogênica, conforme verificado no modelo de edema induzido pela capsaicina;

- O EEVS foi capaz de inibir a formação do edema durante a resposta inflamatória causada por um agente irritante (fenol), indicando uma possível eficácia no tratamento da dermatite de contato irritativa;
- O EEVS preveniu a formação de eventos importantes da resposta inflamatória, como o edema na hipersensibilidade imediata, edema e infiltração de PMN na hipersensibilidade tardia, conforme demonstrado do modelo de edema induzido pela histamina e pela oxazolona, sugerindo assim uma possível eficácia em condições dermatológicas como processos alérgicos e dermatite de contato alérgica;
- O EEVS parece não exercer nenhuma ação sobre a fase de sensibilização no modelo de hipersensibilidade tardia, sugerindo que esse extrato não possui ação imunossupressora e que a reversão da resposta inflamatória nesse modelo seja decorrente da inibição de mediadores inflamatórios envolvidos na resposta inata;
- O EEVS foi eficaz na reversão de vários parâmetros inflamatórios importantes presentes na inflamação crônica, tais como edema, migração de PMN e hiperproliferação celular, porém parece não atuar sobre a migração de leucócitos mononucleares durante o processo inflamatório cutâneo crônico;

Em resumo, os resultados observados nos diferentes modelos de inflamação cutânea utilizados no presente trabalho, sugerem que o efeito antiinflamatório do EEVS pode ser o resultado de um efeito sinérgico decorrente de vários compostos, não-relacionados estruturalmente, que atuam em alvos distintos de forma a promover a reversão das respostas inflamatórias agudas e crônicas, bem como daquelas desencadeadas na resposta de hipersensibilidade imediata e tardia. Nesse contexto, o presente trabalho fornece evidências científicas que validam o uso popular por via tópica da *V. scorpioides* no tratamento de processos inflamatórios cutâneos, bem como demonstra o potencial do extrato bruto desta planta para o desenvolvimento de um novo antiinflamatório tópico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A e LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro Elsevier Editora Ltda, p. 263, 2005.

ALFORD, J.G.; STANLEY, G.; TODDERUD, G.; TRAMPOSCH, K.M. Temporal infiltration of leukocyte subsets into mouse skin inflamed with phorbol ester. **Agents and Actions**, v. 37, p. 260-267, 1992.

ALCARAZ, M.J.; CARVALHO, J.C.T. Flavonóides como agentes anti-inflamatórios. CARVALHO, J.C.T. In: **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo:Tecmedd, 2004.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R.P.; MENCHERINI, T.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55(5), p. 18-23, 2007.

AKAMATSU, H.; KOMURA, J.; ASADA, Y. Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. **Planta Medica**, v.97, p.119-121, 1991.

ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n 3, 2001.

ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69 (1), p. 4-9, 2003.

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. **Methodology in immunology**. V. 162, p. 327-334, 1988.

BARNES, P.J. e KARIN, M. Nuclear factor-kB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**. v. 336, p. 1066-71, 1997.

BARNES, P.J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**. v. 94 (6), p. 557-572, 1998.

BAS, E.; RECIO, M. C.; MÁNEZ, S.; GINER, R.M.; ESCANDELL, J.M.; LOPEZ-GINES, C.; RIOS, J.L. New insight into the inhibition of the inflammatory response to experimental delayed-type hypersensitivity reactions in mice by scopolioside A. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, p. 199-210, 2007.

BHAGWAT, S.S., MANNING, A.M., HOEKATRA; M.F., LEWIS, A. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 472-479, 1999.

BEDI, M.K.; SHENEFELT, P.D. Herbal therapy in dermatology. **Archives of Dermatology**. v.138, p. 232-242, 2002.

BECKER, P.F.L. Inflamação. In: **Patologia Geral**, Brasil: Sarvier, p.140-193, 1997.

BLACK, A.K. ; CAMP, R.D.; MALLET, A.I.; CUNNINGHAM, F.M.; HOFBAUER, M.; GREAVES, M.W. Pharmacologic and clinical effects of lonapalene (RS 43179), a 5-lipoxygenase inhibitor, in psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.95 (1), p. 50-54, 1990.

BLUMENTHAL, R. **The complete German Commission E monographs**. American Botanical Council, New York, 2003.

BORCHERS, A.T.; KEEN, C.L.; STERN, J.D.; GERSHWIN, E. Inflammation and native American medicine: the role of botanicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 339-347, 2000.

BORK, P.M.; SCHMITZ, M.L.; KUHNT, M.; ESCHER, C.; HEINRICH, M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. **FEBS letter**, v. 402, p.85-90,1997.

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

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.

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

BRAND, C.; TOWNLEY, S.L.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, v.51, p. 283-289, 2002.

*BROOKS, P.M.; DAY, R.O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs-differences and similarities. **New England Journal of Medicine**, v. 324 (24), p. 1716-1725, 1991.*

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstruction Surgery**, v. 117 (suppl. 1), p. 1e-S – 32e-S, 2006.

BUCKLE, D.R. e HEDGECOCK, C.J.R. Drug targets inflammation and immunomodulation. **Drug Discovery Today**, v. 2(8), p. 235-332, 1997.

BURBACH, G. J; ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C.A. Cytokines in the skin. In: **the Biology of the Skin**. 1 ed. The New York:Parthenon Publishing Group, p. 299-3319, 2000.

BUSKÜHL, H. **Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxico da mistura e substâncias isoladas da *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers.**, Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí, 2007.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of natural products**, v.67 (12), p. 2141-2153, 2004.

BYOUNG, K.P.; HEO, M.Y.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 expression and skin inflammation in mice by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. **European Journal of Pharmacology**. v. 425, p. 153-157, 2001.

CABRERA, A. L. e KLEIN, R. M. Compostas: 3. Tribo: Vernoniae. **Flora Ilustrada Catarinense**, p 354-355, 1980.

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 κ B (NF- κ B). **Planta Medica**. v. 69, p. 973-983, 2003.

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.

CAMP, R.D. Prostaglandins, hydroxyl fatty acids, leukotrienes and inflammation of the skin. **Clinical Experimental Dermatology**, v. 7 (4), p. 435-344, 1982.

CAMPOS, M. P. **Avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana de extratos e frações da *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers.** Itajaí. Monografia Conclusão de curso - Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), 2001.

CAMPOS, M.; OROPEZA, M.; PONCE, H.; FERNANDEZ, J.; JIMENEZ-ESTRADA M, TORRES, H. REYES-CHILPA R. Relaxation of uterine and aortic smooth muscle by glaucolides D and E from *Vernonia liatroides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 26, p. 112-115, 2003.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. **Nature review molecular cellular biology**, v.6, p.328-340, 2005.

CARLSON, R.P.; O'NEILL-DAVIS, L.; CHANG, J.; LEWIS, A. Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v.17 (2), p. 197-206, p. 1985.

CARVALHO, J.C.T. Constituintes de plantas com atividade anti-inflamatória. CARVALHO, J.C.T. In: **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo:Tecmedd, 2004.

CAUWENBERGH, G. The role of the pharmaceutical industry in drug development in dermatology. **Clinical Dermatology**. v. 20, p. 467-473, 2002.

CEEA, 2003. **Comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Paraná**. Disponível em: <http://bip.ufpr.br/unidades/ceea/index.htm>. Acesso em: 06 Maio, 2006.

CHAN, L.S. **Animal model of human inflammatory skin diseases**. Boca Raton:CRC Press, 2004.

CHI, Y.S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Effects of wogonin, plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1271-1278, 2003.

CHUONG, C.M.; NICKOLOFF, B.J.; ELIAS, P.M., GOLDSMITH, L.A. MACHER, E. MADERSON, P.A. SUNDBERG, J.P.; TAGAMI, H.; PLONKA P.M.; THESTRUP-PEDERSON, K.; BERNARD, B.A. SCHRODER, J.M.; DOTTO, P.; CHANG, C.M. ; WILLIAMS, M.L.; FEINGOLD, K.R.; KING, L.E.; KLIGMAN, A.M., REES, J.L.; CHRISTOPHERS, E. What is the "true" function of skin? **Experimental Dermatology**, v. 11, p. 159-187, 2002.

CLARK, A. Natural Products. WILLIAMS, D. LEMKE, T.L. In: **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

CORREA, M.P.; PENNA, L.A. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.6, 1984.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

CUNHA, R.W. **Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Linchnophora rupestris*, Samir leitão (Vernonia, Compositae)**. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1989

DATTNER, A.M. Herbal and complementary medicine in dermatology. **Dermatologic Clinics**, v. 22, p. 325-332, 2004.

DAVINO, S.C. **Estudo *in vitro* da atividade antifúngica e antibacteriana do extrato de plantas brasileiras da família compositae (Asteraceae) e alguns de seus constituintes**, Dissertação (Mestrado), USP, São Paulo, 1989.

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

DE YOUNG, L.M., KHEIFETS, J.B., BALLARON, S.J., YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, p.335-341, 1989.

DEBENEDICTS, C. JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M., GHOHESTANI, R.F. Immune functions of the skin. **Clinical Dermatology**, v.19, p. 573-585, 2001.

DELHASE, M. I κ B kinase and NF- κ B signaling in response to pro-inflammatory cytokines. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.7, 2003.

DISEPIO, D.; CHANDRARATNA, R.A.; NAGPAL,S. Novel approaches for the treatment of psoriasis. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 222-231, 1999.

DREUX, E. C. **Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato hidroalcoólico de *Vernonia scorpioides* (Lam.) Persoons em inflamação aguda**. Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo, 2005.

DREW, M.G.B.; HITCHAMAN, S.P.; MANN, J. X Ray crystal structure of the sesquiterpene lactone scorpioidine. **J.C.S. Chemical Communication**, v. 27, p. 802-803, 1980.

ERNST, E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. **British Journal of Dermatology**, v.143, p. 923-929, 2000.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569 (3), p. 228-236, 2007.

FIRESTEIN, G.S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 227, 2004.

FITZPATRICK, T.B.; SZABO, G.; SEIJI, M.; QUEVEDO, W.C. Biology of the melanin pigmentary system. FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I.; AUSTEN, K. In: **Dermatology in General Medicine**. New York:McGraw-Hill, p. 131-145, 1979.

FOX, L.P. Farmacologia dermatológica. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro:McGrawHill, p. 1534-1537, 2006.

FREIRE, M.F.I.; ABREU, H.S.; CRUZ, L.C.H.; FREIRE, R.B. Inhibition of fungal growth by extracts of *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Microbiology**, v. 27, p. 1-6 (1996).

FREINKEIL,R.K.; WOODLEY, D.T. Introduction. FREINKEIL,R.K.; WOODLEY, D.T. In: **The Biology of the Skin**. 1 ed. New York :The Parthenon Publishing Group, p.15-17, 2000.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Review Genetics**. v.3, p.199-209, 2002.

FUJII, T.; TANAKA, K.; SAKUMA, S.; OHKUBO, Y; MUTOH, S. Effects of FK506 (tacrolimus hydrate) on chronic oxazolone-induced dermatitis in rats. **European Journal Pharmacology**, v.456, p. 115-121, 2002.

FURSTENBEGGER, G.; CSUK-GLANZER, B.I.; MARKS, F.; KEPPLER, D. Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, v.15(12), p. 2823-2827, 1994.

FURSTENBERGER, G.; SORG, B.; MARKS, F. Tumor promotion by phorbol esters in skin: evidence for a memory effect. **Science**. v. 220, p. 89-91, 1983.

GÀBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.129-131, 2003.

GÀBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÀBOR, M., RAZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents Actions**, v. 36, p. 83-86, 1992.

GARCIA-PIÑERES, A.J.; CASTRO, V.; MORAES, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H.L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 39713-39720, 2001.

GLASS, C.K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, p. 44-55, 2006.

GOMES, D.C.; RIVIEIRA,V.; GIL, ER; VALERI, B.V; TRIANA,J. X ray structure of deoximikanokryptin, a new guaianolide from *Vernonia scorpioides*. **Acta Crystallografica**, v. 43 (11), p. 2216-2218, 1987.

GOODWIN, A.W. WHEAT, H.E. Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. **Annual Reviews in Neuroscience**. v. 27, p. 53-77, 2004.

GOTTLIEB, A.B. Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. **Journal of American Academy Dermatology**. v. 53 , p. s3-16, 2005.

GRASSI, G.A.; FESSELE, S.; MERFORT, I; LINDNMEYER, M.T.; CASTRO V.; MURILLO, R.; NELSON, PJ; AUTENRIETH, B. Sesquiterpene actions inhibit Yersina invasion protein-induced IL-8 and MCP-1 production in epithelial cells. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 295, n. 8, p. 531-538, 2005.

GREEN, C.A. e SHUSTER, S. Lack of effect of topical indomethacin on psoriasis. **Brithish Journal of clinical pharmacology**. v.24, p. 381-384, 1987.

GREENWALD, J. Herbal healing. **Time**. v. 23, p. 58-69, 1998.

GROVES, R.W.; RAUSCHMAYR, T.; NAKAMURA, K.; SARKAR, S.; WILLIAMS, I.R.; KUPPER, T.S. Inflammatory and hyperproliferative skin disease in mice that express elevated levels of the IL-1 receptor (Type I) on epidermal keratinocytes. **Journal of Clinical Investigation**. v. 98(2), p. 336-344, 1996.

GUPTA, M. *et al.* Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats. **Phytomedicine**. v.17, p. 804-806, 2003.

GUTTMAN-YASSKY, E.; LOWES, M.A.; FUENTES-DUCULAN, J.; WHYNOT, J.; NOVITSKAYA, I; CARDINALE, I.; HAIDER, A.; KHATCHERIAN, A.; CARUCCI, J.A.; BERGMAN, R.; KRUEGER, J.G. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 119 (5), p.1210-1217, 2007.

HAAKE, A.; SCOTT, G.A.; HOLBROOK, K.A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. FREINKEIL,R.K.; WOODLEY, D.T In: **the Biology of the Skin**. p.15-17, 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000.

HAASS, N.K.; HERLYN, M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. **JID Symposium Proceedings**. v.10, p. 2, 2005.

HALL, I. H. *et al.* Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 68, p. 537-542, 1979.

HALL, I.H; STARNES, C.O. Jr; LEE K.H.; WADDEL, T.G. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 69, p. 537-543, 1980.

HENKEL, T. Therapeutic innovation. **Drugs**, v. 2 (5), p. 403-404, 1999.

HENNINO,A.; VOCANSON, M.; CHAVAGNAC, C.; SAINT-MEZARD, P.; DUBOIS, B.; KAISERLIAN, D. NICOLAS, J. Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica: papel das células T CD₈ efetora e das células T CD₄ regulatórias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80 (4), p. 335-347, 2005.

HERNÁNDEZ, V.; RECIO, M.C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; RIOS, J.L. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. **Life Sciences**, v. 81, p. 480-488, 2007.

HO, Y.; LAI, C.; LIU, H.; HO, S.; TAI, C.; PAN, M.; WANG, Y. Dihydrolipoic acid inhibits skin tumor promotion through anti-inflammation and anti-oxidation. **Biochemical Pharmacology**. v.73, p.1786-1795, 2007.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacological Review**, v. 43, p. 143-201, 1991.

HOMEY, B.; ASSMANN, T.; VOHR, H.; ULRICH, P.; LAUERMA, A. I.; RUZICKA, T.; LEHMANN, P.; SCHUPPE, H. Topical FK506 suppresses cytokine and costimulatory molecule expression in epidermal and local draining lymph node cells during primary skin immune responses. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 5331-5340, 1998.

HUANG, Y.; DING, Z.H.; LIU, J.K. A new highly oxygenated flavone from *Vernonia saligna*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, p. 347-350, 2003.

HUMES, J.L.; OPAS, E.E.; BONNEY, R.J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. LEWIS, A. e CAPETOLA, R. In: **Advances in Inflammations Research I**. New York: Raven Press, p. 57-65, 1986.

HWANG, D. ; FISCHER, N.H.; JANG, B.C.; TAK, H. ; KIM, J.K.; LEE, W. Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactone in macrophages correlates with inhibition of MAP-kinases. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, v. 226, p. 810-818, 1996.

INOUE, H., NAGATA,N. KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. **Brithsh Journal of Pharmacology**. v.110, p. 1614-1620,1993.

IWALEWA, E. O.; IWALEWA, O.J.; ADEBOYE, J.O. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 229-234, 2003.

KIMATA, M.; SHICHIJO, M.; MIURA, T.; SERIZAWA, I.; INAGAKI, N.; NAGAI, H. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 501-508, 2000.

KOCH, E.; KLAAS, C. A.; RÜNGELER, V.C.; MORA, G.; VICHNEWSKI, W.; MERFORT, I. Inhibition of inflammatory cytokine production and lymphocyte proliferation by structurally different sesquiterpene lactones correlates with their effect on activation of NF-Kb. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 795-801, 2001.

KOS, O.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; POVEDA, L.; MERFORT, I. *Ent*-kaurane glycosides and sesquiterpene lactones of the hirsutinolide type from *Vernonia triflosculosa*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 62-69, 2006.

KOSTER, M.I. e ROOP, D.R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **European Journal of Cellular Biology**, v.83, p. 625-629, 2004.

KORYSTOV, Y.N.; SHAPOSHNIKOVA, V.V.; KORYSTOVA, A.F.; EMEL'YANOV, M.O. Detection of reactive oxygen species induced by radiation in cells using the dichlorofluorescein assay. **Radiation Research**, v. 168, p. 226-232, 2007.

KRISHNA-KUMARI, G. N.; MASILAMANI S.; GANESH, M.R.; ARAVIND, S.; SRIDHAR, S.R. Zaluzanin D: a fungistatic sesquiterpene from *Vernonia arborea*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 479-482, 2003.

KRUEGER, J.G. e BAWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Annual Rheumatic diseases**, v. 64 (supl., II), p. 30-36, 2005.

KUO, Y.H.; KUO, Y.J.; YU, A.S.; WU, M.D.; ONG, C.W.; YANG-KUO, L.M.; HUANG, J.T.; CHEN, C.F., LI, S.Y. Two novel sesquiterpene lactones, cytotoxic vernolide_A and B, from *Vernonia cinerea*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 425-426, 2003.

^aKUPPER, T.S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and Speculations. **Journal of Clinical Investigation**. v. 86, p. 1783-1789, 1990.

^bKUPPER, T.S. The role of epidermal cytokines. In: SHEVACH, E. e OPPENHEIM, **Immunophysiology: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation**.). New York:Oxford University Press, p. 285-305, 1990.

LAMBERTINI, E.; PIVA, R.; KHAN, M.T. LAMPRONTI, I. BIANCHI, N.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R. Effects of extracts from Bangladeshi medicinal plants on *in vitro* proliferation of human breast cancer cell lines and expression of estrogen receptor alpha gene. **International Journal of Oncology**, v. 24, p. 419-423, 2004.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2000.

LASSUS, A. e FORSSTROM, S. A dimethoxynaphthalene derivative (RS-43179 gel) compared with 0,025% fluocinolone acetonide gel in the treatment of psoriasis. **British Journal of Dermatology**. v. 113, p. 103-106, 1985.

LEE, J.L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D.R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, p. 294-306, 2003.

LEITE, S.N.; PALHANO, G.; ALMEIDA, S.; BIAVATTI, M.W. Wound healing activity and systemic effects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. **Fitoterapia**, v. 73, p. 496-500, 2002.

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M., HOWEL, M.D.; NOMURA, I. HAMUD, Q. A. New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 651-657, 2004.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacol Research**. v. 27(4), p. 442-448, 2004.

LJUBOJEVIC, S.; LIPOZENELE, J.; BRENNER, S.; BUDIMELE, D. Pemphigus vulgaris: a review of treatment over a 19 year period. **Journal European Academy of Dermatology Venereology**. v. 16, p. 599-603, 2002.

LLORET, S. e MORENO, J.J. Effects of an antiinflammatory peptide (antiflammin-2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol drmal application. **Biochemical Pharmacology**. v. 50 (3), 347-353, 1995.

LOPES, J.L.C. Sesquiterpenes lactones from Vernonia. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, supl II, p. 227-230, 1991.

LORENZI, H. **Ervas Daninhas do Brasil**. São Paulo: Ed.: do autor, p. 108, 1982.

LYSS, G.; SCHIMIDT, T.J.; MERFORT, Y.; PAHL, H.L. Helenalina on anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF-kappaB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 378, p. 951-961, 1997.

MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. The conversion stage of skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 11 (12), p. 2085-92, 1990.

MAZUMDER, U.K. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. **Phytomedicine**, v. 10, p.185-188. 2003.

MERFORT, I. *Arnica: new insights on the molecular mode of action of a traditional medicinal plant.* **Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.** v. 10 (suppl. 1), p. 45-48, 2003.

MEURER, R.; OPAS, E.E.; HUMES, J.L. Effects of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on inflammation associated with oxazolone-induced delayed hypersensitivity. **Biochemical Pharmacology**, v.37, p. 3511-3514, 1988.

MEYER, S.; VOGT, T.; LANSTHALER, M.; KARRER, S. Use of phytopharmaceutical agents in dermatology. Indications, therapeutic approaches and side effects. **Hautarzt.** v. 56(5), p. 483-99, 2005.

MIZUTANI, H.; BLACK, R. KUPPER, T.S. Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. **Journal of Clinical Investigation.** v. 87, p. 1966-1971, 1991.

MORAES, M. D. A família Astearaceae na planície litorânea de Picinguaba, **Dissertação de mestrado**, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil, 1997.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumors: Old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 735-744, 2006.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**. v.71, p. 1331-1336, 2006.

MUREGI, F.W.; CHABRA, S.C.; NJAGI, E.N.; LANG'AT-THORUWA, C.C.; NJUE, W.M.; ORAGO, A.S.; OMAR, S.A.; NDIEGE, I.O. In vitro antiplasmodial activity of some plants used in Kisii, Kenia against malaria and their chloroquine potencial effects, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 235-239, 2003.

MYHRE, O.; ANDERSEN, .M.; AARNES, H.; FONNUM, F. Evaluation of the probes 2',7'- dichlorofluorescein diacetate, luminal and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1575-1582, 2003.

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAL, K.; HYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: defferential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35 (9), p. 997-1007, 2003.

NERGARD, C.S.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T.E.; MALTERUD, K.E., KIYOHARA, H. MATSUMOTO, T. YAMADA, H. PAULSEN, B.S. Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 141-152, 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17 (3), p. 215-234, 2000.

NICKOLOFF, B.J. e NESTLÉ, F.O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **Journal Clinical Investigation**, v.13, p. 1664-1675, 2004.

NORRIS, D.A. Structure and function of the skin. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 2444-2446, 2004.

OHUCHI, K. e TSURUFUJI, A. A study of the anti-inflammatory mechanism of glycyrrhizin. **Mino Medical Review**, v.27, p. 188-193.

OKIMASU, E.; MOROMIZATO, Y.; WATANABE, S. Inhibition of phospholipase A2 and platelet aggregation by glycyrrhizin an antiinflammation drug. **Acta Medical Okayama**. v. 37, p. 385-391, 1983.

PAHL, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors. **Oncogene**, v.18, p. 6853-6866, 1999.

PAGNO, L.; BLIND, L.Z.; BIAVATTI, M.W; KREUGUER, M.R.O. Cytotoxic activity of dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 1483-1491, 2006.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PARK, K.K.; PARK, J.H.; JUNG, Y.J.; CHUNG, W.Y. Inhibitory effects of chlorophyllin, hermin and tetrakis (4-benzoic acid) porphtrin on oxidative DNA damage and mouse skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible anti-tumor promoting mechanisms. **Mutation Research**, v. 542, p. 89-97, 2003.

PÉREZ-GARCIA, F.; MARIN, E.; CANIGUERAL, S.; ADZET, T. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis*: involvement of an antioxidant mechanism. **Life Sciences**, v.59 (24), p. 2033-2040, 1996.

PHILLIPSON, J. D. New drugs from nature-it could be yew. **Phytotherapy Research**, v.13, p. 2-8, 1999.

POBER, J.S.; SESSA, W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, 2007.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2000.

PRIETO, J.M.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MÁÑEZ,S. RIOS, J.L. Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, v. 131-137, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. Rio de Janeiro:Elsevier, 6 ed., 2007.

RECIO, M.C., GINER, R.M., URIBURU, L., MÁÑEZ, S., CERDÁ, M., De LA FUENTE, J.R., RIOS, J.L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Science**. v. 66, p. 2509-2518, 2000.

ROBERT, C. e KUPPER, T.S. Inflammatory skin diseases, Tcells and immune surveillance. **New England Journal Medicine**, v. 341, p. 1817-1828, 1999.

ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. **Histologia: Texto e Atlas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica Panamericana, p. 347, 1993.

ROTA, C.; CHIGNELL, C. F.; MASON, R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'- dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 873-881, 1999.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T.J. Inhibition of transcription factor NF-kB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2343-2352, 1999.

RUSSEL-JONES, R.; POWELL, A.M.; ACLAND, K.; CALONJE, E.; O'DOBERTY, M.; HEALY, C. The chances of a patient with melanoma developing in transit disease are doubled by undergoing sentinel lymph node biopsy (SLNB). **European Journal of Surgery Oncology**, v.31, p.210-211, 2005.

RYAN, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. **The International Research and Review Journal for Microscopy**, v. 35, p. 161-171, 2004.

SADIK, C. D.; SIES, H.; SCHEWE, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonóides: structure-activity relations and mode of action. **Biochemical Pharmacology**, v.65, p. 773-781, 2003.

SAMPAIO, S. A.P; CASTRO, R.M.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia Básica**, 2 ed. São Paulo:Artes médicas, p. 1-5, , 2000.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy**, 5 ed., Stockholm:Swedish Pharmaceutical Press, 2004.

SANCHEZ, T. e MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 877-879, 1999.

SCHÄCKE, H; DÖCKE, W.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, p. 23-43, 2002.

SCHAERLI, P.; BRITSCHGI, M. KELLER, M.; STEINER, U.C.; STEINMANN, L.S.; MOSER, B. PICHLER, W.J. Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. **Journal of Immunology**. v. 173, p. 2151-2158, 2004.

SCHIMMER, B.P. e PARKER, K.L. Hormônio adrenocorticotrópico: esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e da ações dos hormônios adrenocorticais. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro:McGrawHill, 2006.

SCHOEPE, S.; SCHACKE, H. MAY, E.; ASADULLAH, K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. **Experimental Dermatology**. v. 15 ,p. 406-420, 2006.

SCHOLZ, K.; FURSTENBERGER, G.; MULLER-DECKER, K.; MARKS, F. *Differential expression of prostaglandin-H synthase isoenzymes in normal and activated keratinocytes in vivo and in vitro.* **Biochemical Journal**, v. 309, p. 263-269, 1995.

SCHOLZEN, T.E.; STANDER, S.; RIEMANN, H.; BRZOSKA, T.; LUGER, T.A. *Modulation of cutaneous inflammation by angiotensin-converting enzyme.* **Journal of Immunology**, v. 170 (7), p. 3866-3873, 2003.

SCHRAMM, R e THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation inhibitory mechanisms of glucocorticoids. **Inflammation research**, v.53 (12), p. 644-652, 2004.

SEGRE, J.A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **Journal of Clinical Investigation**. v.116 (5), p. 1150-1158, 2006.

SERHAN, N.C. e SAVIL, J. Resolution of Inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6 (12), p.1191-1197, 2005.

SHAEFER, H. e REDELMEIER, T. E. **Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption**. Switzerland :Karger, p. 1-3, 1996.

SHERWOOD, E.R e TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**. v. 18 (3), p. 385-405, 2004.

SHIN, Y; BAE, E.; KIM, S. LEE, Y. KIM, D. Effect of ginsenoside Rb1 and compound K in chronic oxazolone-induced mouse demartitis. **International of Immunopharmacology**, v.5, p. 1183-1191, 2005.

SHINELLA, G.R.; GINER, R.M.; RECIO, M.C; MORDUJOVICH-BUSHIAZZO, P.; RIOS, J.L.; MAÑEZ, S. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, n. 50, p. 1069-1074, 1998.

SIEDLE, B.; GUSTAVASSON, L., JOHANSSON, S.; MURILLO, R.; CASTRO, V.; BOHLIN, L.; MERFORT, I. The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. **Biochemical Pharmacology**. v. 65, p. 897–903, 2003.

SIEDLE, B., GARCIA-PINERES, A.J., MURILLO, R., SCHULTE-MÖNTING, J., CASTRO, V., RÜNGELER, P., KLAAS, C.A., DA COSTA, F.B., KISIEL, W., MERFORT, I. Quantitative structure–activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NFjB. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 47, p. 6042–6054, 2004.

SILVA, C.S. e CARVALHO, J.C.T. Inflamação. CARVALHO, J.C.T. In: **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo:Tecmedd, 2004.

SIMMONS, D.L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug Discovery Today**, v.11(5/6), p. 210-219, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2000.

SKINNER, R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 8 (3), p. 22-31, 2005.

SLAGA, T.J. Multistage skin carcinogenesis: a useful model for the study of the chemoprevention of cancer. **Acta Pharmacology Toxicology**. v. 55 (2), p. 107-124, 1984.

SOSA, S.; BALICK, M.J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R.G.; PIZZA, C.; ALTINIER, G.; TUBARO, A. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some central american plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 211-215, 2002.

STANLEY, P.L., STEINER, S., HAVENS, M., TRAMPOSH, K.M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology**, v. 4, p. 262-271, 1991.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v.5, p. 39-41, 2000.

TAN, J. K.; APHALE, A.; MALAVIYA, R.; SUN, Y.; GOTTLIEB, A.B. Mechanisms of action of etanercept in psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. v. 12, p. 38-45, 2007.

TCHINDA, A.T.; TANE, P.; AYAFOR, J.F.; CONNOLLY, J.D. Stigmastane derivatives and isovaleryl sucrose esters from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 63, p. 841-846, 2003.

TERUI, T. Inflammatory and immune reactions associated with stratum corneum and neutrophils in sterile pustular dermatoses. **Tohoku Journal Experimental Medicine**. v.190, p. 239-248, 2000.

THEOHARIDES, T.C.; KEMPURAJ, D.; TAGEN, M.; CONTI, PIO; KALOGEROMITROS, D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. **Immunological Reviews**, v.217, p. 65-78, 2007.

TOIGO, L.; OLIVEIRA, R.F.; MARQUES, O.M. Caracterização farmacobotânica, estudo do óleo essencial e atividade antimicrobiana da erva de São Simão, *Vernonia*

scorpioides (Lam.) Pers. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 85(2), p.49-55, 2004.

TOWBIN, H.; PIGNAT, W.; WIESENBERG, I. Time-dependent cytokine production in the croton oil-induced mouse ear oedema and inhibition by prednisolone. **Inflammation Research**, v. 44 (supp.2), p. S160-S161, 1995.

TUCKERMANN, J.P.; KLEIMAN, A.; MORIGGI, R.; SPANBROEK, R.; NEUMANN, A.; ILLING, A.; CLAUSEN, B.E.; STRIDE, B.; FORSTER, I.; HABENICHT, A.J.R.; REICHARDT, H.M.; TRONCHE, F.; SCHMID, W.; SCHATZ, G. Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p.1381-1390, 2007.

TURNER, D.M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 39-44, 1996.

UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of Dermatological Science**, v. 24 (1), p. 29-38, 2000.

UEDA, H.; YAMAZAKI, M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.25 (9), p. 1197-1202, 2002.

VALÉRIO, D.A.R.; CUNHA, T.M.; ARAKAWA, N.S.; LEMOA, H.P.; COSTA, F.B.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI Jr., W.A. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 562 (1-2), p. 155-163, 2007.

VANE, J.R. e BOTTING, R.M. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, v. 104 (3A), p. 2S-8S, 1998.

VEERPORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 52, p. 253-262, 2000.

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L.; FREED, I.; HOWELL, B.G.; SHAHID, S., SHIVJI, G.M.; MAK, T. W.; SAUDER, D.N. CD₄⁺ Th1 and CD₈⁺ type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 6783-6790, 2000.

WARNING, U.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; JONES, S.B. Scorpiolide, a new type of sesquiterpene lactone from *Vernonia scorpioides*. **Liebigs Annalen Der Chemie**, v. 5, p. 467-468, 1987.

WERTH, V.P. Principles of therapy. In: GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 2462, 2006.

WILLIAMS, I.R. e KUPPER, T.S. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life sciences**, v. 58 (18), p. 1485-1507, 1996.

WILLIAMSON, E.M. **Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material**. Willey & sons Ltd.:Chinchester, 1996.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102 (6), p. 915-922, 1994.

WINYARD, P.G. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.3-4, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Geneva, 2002.

YANAMATO, Y.; GAYNOR, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107 (2), p.135-142, 2001.

YOUNG, J.M., SPIRES, D.A., BEDORD, C.J., WAGNER, B., BALLRON, S.J., DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367- 371, 1984.

YOUNG, J.M.; WAGNER, B.; SPIRES, D.A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear oedema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 48-52, 1983.

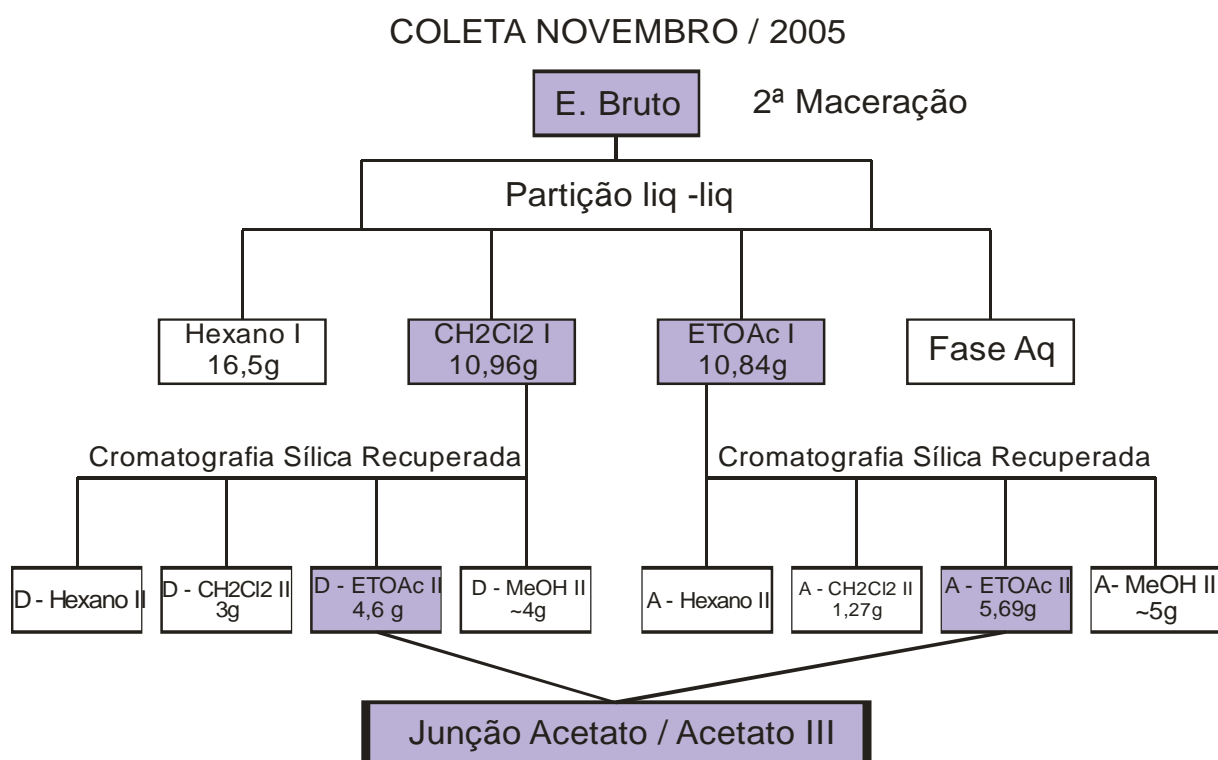
ZEGARSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmaceutical Reports**, v. 58, p. 13-21, 2006.

ZHENG, Y.N.; ZHANG, J.; HAN, L.K.; SEKIYA, K.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Effects of compounds in leaves of *Salix matsudana* on arachidonic acid metabolism. **Yakugaku Zasshi**, v. 125 (12), p. 1005-1008, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC,2000.

ANEXOS

**FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DA
*Vernonia scorpioides***



FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO LUTEOLINA

