

**SHIRLEY BOLLER**

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DO EXTRATO E COMPOSTOS  
ISOLADOS DA *Baccharis illinita* DC, (*Asteraceae*) EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia,  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander R. Zampronio

Co-orientador: Prof. Dr. Michel F. Otuki

**CURITIBA**

**2007**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Eloy e Elfi, e ao meu irmão, Christian, pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.*

# Agradecimentos

À Universidade Federal do Paraná

Ao orientador, Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio, pela oportunidade e confiança, pela orientação e pelos seus valiosos conhecimentos e ensinamentos durante essa caminhada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Michel F. Otuki pelo respeito, instrução, paciência e confiança na minha capacidade e no meu trabalho. Você foi imprescindível na minha formação. Por sua *culpa*, vislumbrei um ideal na área científica.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela de Almeida Cabrini, mais que uma professora, uma amiga com quem interagi por pouco tempo no laboratório, mas que foi um tempo inesquecível, e com quem participei de lutas que me trouxeram cada vez mais experiência e amadurecimento e, sem dúvida, uma professora no sentido profundo da palavra.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Consuelo A. Marques, pelas preciosas sugestões neste trabalho, e ao Prof. Dr. Moacir Pizzolatti pelo fornecimento do extrato e compostos isolados da *B. illinita*.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia e aos professores responsáveis pela minha formação.

Aos meus amigos-irmãos mestres Eduardo e Márcia, pessoas que sempre foram exemplos de coragem, amor, determinação, retidão e perseverança.

A minha colega de mestrado e acima de tudo amiga, Renata dos Reis pela quase “uma década” de convivência, paciência, ensinamentos, reflexões, estudos e que participou comigo em vários momentos importantes que superamos com determinação.

Aos meus colegas-amigos de pesquisa: Maria Fernanda, Juliana Chichorro, Evelise, Jaqueline, Franciane, Alliete, Laryssa e Artur pelos momentos de aprendizado, apoio nos experimentos, incentivo, confiança e claro, muita diversão. Enfim, a todos os meus colegas de mestrado e às minhas amigas Haiét Záki, Karina Quadrado e Andrezza Beatriz Oliveira pela sempre boa companhia e convivência.

Aos funcionários-amigos Sílvia, Izonete, Lindacir, Nair, Cândido, Luiz, Julio, Iselen, Alessandra que são exemplos de pessoas com uma forma toda especial de ser e incentivar.

Aos animais, meu eterno respeito e gratidão, pois sem eles, uma grande parte do meu trabalho não seria possível.

O mais importante da vida não é  
saber onde estás, mas sim para  
onde vais.

(Goethe)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 ANATOMIA, FISIOLOGIA E FUNÇÃO DA PELE.....	2
1.2 FISIOLOGIA CUTÂNEA.....	8
1.3 INFLAMAÇÕES CUTÂNEAS.....	16
1.4 FARMACOLOGIA DA INFLAMAÇÃO.....	24
1.5 PLANTAS COMO MEDICAMENTO.....	29
1.5.1 Família: <i>Asteraceae</i> .....	30
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	34
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	37
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>B. illinita</i> DC.....	37
3.2.1 Extrato bruto hidroalcoólico.....	37
3.2.2 Extrato em acetona.....	38
3.3 DROGAS, DOSES E SOLUÇÕES.....	40
3.3.1 Drogas e doses.....	40
3.3.2 Soluções.....	41
3.4 ANIMAIS.....	42
3.5 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA.....	42
3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	43
3.6.1 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato).....	43

3.6.2 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina.....	43
3.6.3 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico.....	44
3.6.4 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de oxazolona.....	44
3.7 MEDIDA DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE.....	45
3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	46
3.9 INDUÇÃO DE PRURIDO EM CAMUNDONGOS.....	46
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1 EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>B. illinita</i> DC SOBRE O EDEMA DE ORELHA E MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO POR TPA.....	49
4.2 ANALISE HISTOLÓGICA RELATIVA À ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>B. illinita</i> DC.....	51
4.3 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA <i>B. illinita</i> DC SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA.....	53
4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO DA <i>B. illinita</i> DC SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA CAPSAICINA.....	58
4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>B. illinita</i> SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	59
4.6 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE OXAZOLONA.....	60
4.7 EFEITO DA <i>B. illinita</i> DC SOBRE O PRURIDO INDUZIDO PELO COMPOSTO 48/80 .....	63
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UMA SECÇÃO TRANSVERSAL DA EPIDERME.....	3
FIGURA 2	ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UMA SECÇÃO TRANSVERSAL DA EPIDERME, MOSTRANDO OS RECEPTORES CUTÂNEOS	6
FIGURA 3	FISIOPATOLOGIA DA DERMATITE DE CONTATO ALÉRGICA	12
FIGURA 4	DERMATITE ATÓPICA.....	14
FIGURA 5	ESQUEMA SIMPLIFICADO DA PSORÍASE VULGAR.....	15
FIGURA 6	MECANISMO SIMPLIFICADO DA MIGRAÇÃO CELULAR.....	20
FIGURA 7	ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS PELA COX.....	27
FIGURA 8	EXEMPLARES DE <i>Baccharis illinita</i> DC.....	33
FIGURA 9	COMPOSTOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ACETATO DA <i>Baccharis illinita</i> DC.....	39
FIGURA 10	EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Baccharis illinita</i> DC SOBRE O EDEMA DE ORELHA E MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO PELO TPA.....	50
FIGURA 11	CORTES TRANSVERSAIS DE ORELHAS DE CAMUNDONGOS.....	52
FIGURA 12	EFEITO DO ÁCIDO KAURENÓICO SOBRE O EDEMA DE ORELHA E MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO PELO TPA.....	54
FIGURA 13	EFEITO DO $\alpha$ -SPINASTEROL SOBRE O EDEMA DE ORELHA E MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO PELO TPA.....	55
FIGURA 14	EFEITO DO ÁCIDO OLEANÓLICO SOBRE O EDEMA DE ORELHA E MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO PELO TPA.....	56
FIGURA 15	EFEITO DO BAURENOL SOBRE O EDEMA DE ORELHA E MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO PELO TPA.....	57
FIGURA 16	EFEITO DO EXTRATO DE <i>Baccharis illinita</i> DC SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR CAPSAICINA.....	58
FIGURA 17	EFEITO DO EXTRATO DE <i>Baccharis illinita</i> DC SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	59

FIGURA 18	EFEITO DO EXTRATO DE <i>Baccharis illinita</i> SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE TARDIA INDUZIDA POR OXAZOLONA.....	61
FIGURA 19	EFEITO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE SOBRE A HIPERSENSIBILIDADE TARDIA POR OXAZOLONA	62
FIGURA 20	EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Baccharis illinita</i> DC SOBRE O COMPORTAMENTO DE PRURIDO INDUZIDO PELO COMPOSTO 48/80.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AA – Ácido Araquidônico  
ACh – Acetilcolina  
Ag – Antígeno  
AINEs – Antiinflamatório não Esteroidal  
AMPc – Monofosfato Cíclico de 3' 5' – Adenosina  
APC – Células Apresentadoras de Antígeno  
CGRP – Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina  
COX – Ciclooxigenase  
DA – Dermatite Atópica  
DCA – Dermatite de Contato Alérgica  
DI50 – Dose do extrato ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle  
DMF – Dimetilformamida  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
GMPc – Guanosina Monofosfato Cíclico  
HTAB – Hexadeciltrimetilamônio  
IFN – Interferon  
Ig – Imunoglobulina  
IL – Interleucina  
LT – Leucotrieno  
mDO – Mili-densidade Óptica  
MHC - I – Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo I  
MHC - II – Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo II  
MNCF – Fator Quimiotático para Neutrófilos derivado de Macrófagos  
MPO – Mieloperoxidase  
NaOAc – Acetato de Sódio  
NF – Fator Nuclear  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PGs – Prostaglandinas  
PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub>  
SP – Substancia P

Th – Células T helper

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TPA – 12 –O-tratradecanoilforbol acetato

TX A<sub>2</sub> – Tromboxano A<sub>2</sub>

C – Controle

NK – Natural Killer

## RESUMO

*Baccharis illinita* DC é um arbusto pertencente à família das *Asteraceae*. A infusão com as folhas e cascas têm sido utilizada pela população como agente antiinflamatório, protetor gástrico e anti-infeccioso. Possui grande quantidade de flavonóides e terpenos que já estão descritos na literatura por exercerem efeitos antiinflamatórios. No entanto, existem poucos dados de sua utilização para o tratamento de doenças cutâneas.

Nesse estudo, foi utilizado o modelo de edema de orelha em camundongos (Swiss machos, pesando entre 25 a 30g) induzido pelo 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), ácido araquidônico (AA), capsaicina (CAP) ou oxazolona (OX) em camundongos. Avaliamos também o efeito do extrato bruto das folhas da *B. illinita* DC (EB) sobre a migração celular através da histologia e da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA, bem como no modelo da OX. Adicionalmente, foi avaliado o efeito do EB sobre o prurido induzido pelo composto 48/80.

EB (0,1-1mg/sítio) inibiu de forma dose dependente o edema induzido pelo TPA, com  $DI_{50}$  de 0,19 (0,15 – 0,23 mg/sítio) e  $I_{máx}$  de  $73 \pm 5\%$  bem como a atividade da MPO com  $DI_{50}$  de 0,21 (0,18 – 0,25 mg/sítio) e  $I_{máx}$  de  $71 \pm 5\%$ . As frações hexano (*He*), acetato de etila (*AcOEt*) e acetona (*Ac*) obtidas da *B. illinita* indicaram presença de atividade anti-inflamatória (porcentagem de inibição 0,6mg/Kg de 81,5%, 79,2% e 72,7% respectivamente). Os compostos isolados da fração *AcOEt* ácido kaurenóico (*Ak*),  $\alpha$ -Spinasterol ( $\alpha$ -*Spi*), Ácido oleanólico (*Ao*) também inibiram o edema de orelha induzido pelo TPA com  $DI_{50}$  de 2,01 (1,62 – 2,49); 2,16 (1,48 – 3,16); 2,08 (1,69 – 2,56 mg/sítio) e  $I_{max}$  de  $71 \pm 5\%$ ,  $65 \pm 6$ ,  $71 \pm 2\%$ . O baurenol foi pouco efetivo na redução do edema induzido pelo TPA ( $30 \pm 6\%$ ). Somente os compostos  $\alpha$ -*Spi* e *Ao* reduziram a atividade da MPO com  $I_{max}$  de  $36 \pm 17$  e  $36 \pm 6\%$  respectivamente. Os cortes histológicos confirmaram a redução do edema bem como a migração de neutrófilos induzido pelo EB. O EB e a indometacina (INDO – antiinflamatório não esteroide) inibiram o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico, com inibição máxima de  $50 \pm 6\%$  e  $58 \pm 5\%$  respectivamente. No entanto o EB não modificou a resposta à capsaicina. A hipersensibilidade tardia induzida pela oxazolona (OX) foi reduzida com a aplicação tópica do EB (1mg/sítio) e dexametasona (0,5mg/sítio) quando administrado na fase de indução ou nas duas fases (sensibilização e indução) da resposta alérgica mas não quando administrado somente na sensibilização com OX. A redução do edema de orelha foi observada até 72h após a administração de OX. A administração do composto 48/80 induziu intenso comportamento de prurido nos camundongos e o EB (1000mg/kg), administrado oralmente, foi capaz de reduzir de forma significativa essa resposta em  $53 \pm 11\%$ .

Em conclusão, esses resultados indicam que o EB e seus compostos isolados da fração *AcOEt* possuem atividade antiinflamatória tópica. Todos os compostos desse extrato possuem atividade antiedematogênica, porém o *Ao* também foi capaz de reduzir a migração celular, indicando diferentes mecanismos de ação desses compostos. A atividade antiinflamatória do extrato bruto da *B. illinita* parece resultar da ação sinérgica desses compostos.

## ABSTRACT

*Baccharis illinita* DC is a shrub from the *Asteraceae* family. The infusion made with the leaves and bark have been used by the population as anti-inflammatory, for gastric protection and as an anti-infectious agent. A large amount of flavonoids and terpens with anti-inflammatory activity has been obtained from this extract but no data is available about its potential topical use. This study aimed to evaluate the topical anti-inflammatory activity of the crude extract of leaves of *Baccharis illinita* DC (CE) and some of compounds isolated from this extract.

In this study we used ear edema in mice (male, Swiss, weighting 25-30 g) induced by 12-O-tetradecanoilforbol acetate (TPA), arachidonic acid (AA), capsaicin (CAP) or oxazolone (OX). We also evaluated the effect of the CE on the cellular migration by qualitative histology and by evaluating the myeloperoxidase activity (MPO) in the model of ear edema induced by TPA and OX. Additionally, the effect of CE on pruritus induced by compound 48/80 was evaluated. CE (0.1-1mg/ear) inhibited dose-dependently the edema induced by TPA, with ID<sub>50</sub> 0.19 (0.15 – 0.23mg/ear) and I<sub>max</sub> 73 ± 5% as well as the activity of the MPO with ID<sub>50</sub> 0.21 (0.18 – 0.25mg/ear) and I<sub>max</sub> 71 ± 5%. Partition of CE originated hexane, ethyl acetate (AcOEt) and acetone fractions. The screening of the pharmacological activity of these fractions indicated the presence of anti-inflammatory activity in all of them (percentage of inhibition at 0.6mg/site of 81.5%, 79.2% and 72.7%, respectively). The isolated compounds from the AcOEt fraction, kaurenoic acid (KA), α-Spinasterol (α-Spi), oleanolic acid (OA) also inhibited TPA-induced ear edema with ID<sub>50</sub> 2.01 (1.62 – 2.49), 2.16 (1.48 – 3.16), 2.08 (1.69 – 2.56mg/ear) and I<sub>max</sub> 71± 5%, 65±6, 71 ± 2%, respectively. Baurenol was less effective in reducing TPA-induced oedema (30 ± 6%). Only α-Spi and OA reduced the activity of the MPO with maximal inhibition of 36± 17 and 36± 6% respectively. Histological analysis of the ear confirmed the reduction of edema as well as of the neutrophil migration induced by CE. CE and the nosteroidal anti-inflammatory drug indomethacin (INDO) inhibited the arachidonic acid-induced ear edema (with maximal inhibition of 50±6% and 58±5%, respectively). However, the CE did change the capsaicin-incuded edema. The delayed hypersensitivity induced by oxazolone (OX) was reduced with the topical application of the CE (1mg/ear) and dexamethasone (0.5mg/ear) when administrated in the induction phase or in both the phases (sensitization and induction) of the allergic response but not when administrated only before the sensitization with OX. The reduction of ear edema was observed until 72h after the administration of OX. The administration of compound 48/80 induced an intense pruritus behavior in the mice. CE (1000mg/kg), in this case administrated orally, was also able to reduce of significantly this response (53 ± 11%). In conclusion, these results indicate that the CE and the isolated composites of the fraction of ethyl acetate have a topical anti-inflammatory effect. There are several compounds in this extract with antiedematogenic activity but the OA was also able to reduce the cellular migration, indicating different mechanisms of actions for these compounds. Overall, the anti-inflammatory activity of the extract from *B. illinita* seems to be the result of a synergic action of these compounds.

# **1. INTRODUÇÃO**

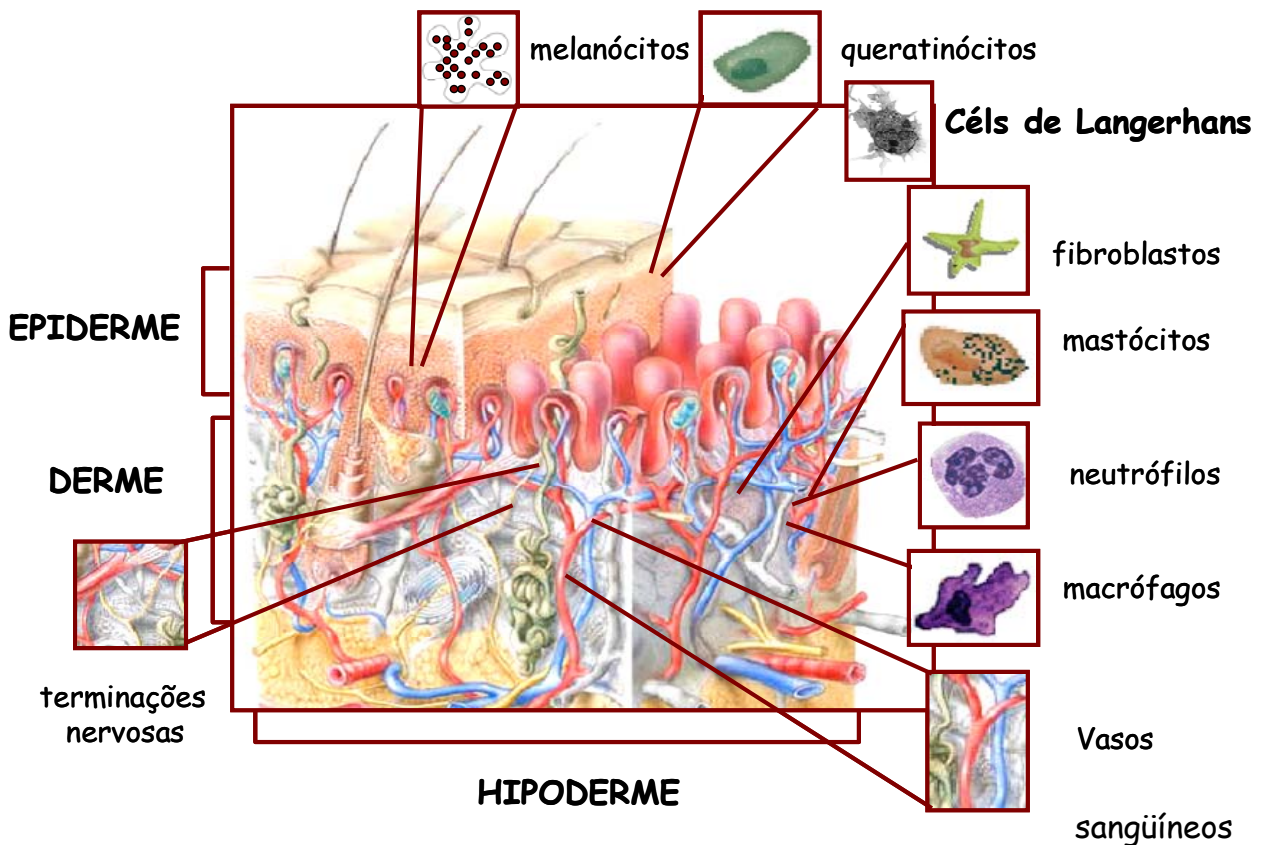
## 1.1. ANATOMIA, FISIOLOGIA E FUNÇÃO DA PELE

A pele ou *cútis* é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior. Constitui-se em uma complexa estrutura de tecidos de várias naturezas, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se, de maneira harmônica, ao desempenho de suas funções. É considerada o maior órgão do corpo humano representando 15% do peso corpóreo. A pele compõe-se, essencialmente, de três grandes camadas: uma camada superior – a epiderme; uma camada intermediária – a derme ou *cório*; e uma camada profunda, a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).

### *A epiderme*

A epiderme é um tecido multiestratificado, do tipo pavimentoso, e sendo constantemente renovado através de uma diferenciação progressiva (queratinização e cornificação), que começa na camada basal em direção à camada superficial (*córnea*). A proliferação, a diferenciação e a morte celular ocorrem seqüencialmente e cada processo é caracterizado pela expressão de proteínas específicas, sendo que certas doenças podem ser decorrentes de anomalias nessas proteínas (CANDI et al., 2005).

A epiderme é composta por múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias, como os queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans (FIGURA 1) (FREINKEL e WOODLEY, 2000). Os queratinócitos são células responsáveis pela formação do epitélio estratificado pavimentoso e são consideradas as células mais importantes para manter a integridade estrutural da epiderme. A camada basal da epiderme, denominada epitélio germinativo, é constituída por células que se multiplicam continuamente. Desta maneira, as novas células geradas empurram as mais velhas para cima, em direção à superfície. À medida que envelhecem, as células epidérmicas tornam-se achatadas, e passam a fabricar e a acumular queratina, uma proteína resistente e impermeável. Quando atingem a superfície, os queratinócitos transformam-se em um invólucro morto de queratina, formando uma barreira física (camada *córnea*) (MONTAGNA e PARAKKAL, 1974).



**FIGURA 1.** Esquema simplificado de uma secção transversal da pele. Fonte: Adaptado de SAMPAIO e RIVITTI, 2000.

Em condições normais da epiderme, o estágio de proliferação na camada basal é precisamente balanceado pela descamação da camada córnea na superfície da pele (CANDI et al., 2005).

Existe cerca de 30 diferentes tipos de queratina, cada uma codificada por diferentes tipos de genes. A utilização de anticorpos monoclonais permitiu um mapeamento dessas queratinas através de sua localização exata no epitélio e seus anexos. Desta forma dividiu-se a epiderme em compartimentos basal, pela presença de citoqueratina K5 e K14, e suprabasal pela presença de citoqueratina K1 e K10 (SAMPAIO e RIVITTI, 2000; CANDI et al., 2005).

Outro tipo celular presente na epiderme são os melanócitos (FIGURA 1) que possuem natureza dendrítica, com numerosos prolongamentos longos e ramificados, que se relacionam com células espinhosas supradjacentes. Sua função é produzir pigmentação à pele. Além da pele, os melanócitos são encontrados no aparelho ocular, na retina, no ouvido, no sistema nervoso central,

nas mucosas e pêlos (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). Os melanócitos representam 13% da população celular da epiderme, se distribuem por toda a extensão da epiderme e através de seus dendritos distribuem a melanina que produzem para os queratinócitos (CUCÉ e NETO et al., 2001).

Além dos melanócitos, existem outras células dendríticas na epiderme, as células de Langerhans (FIGURA 1). As células de Langerhans constituem 2 a 8% da população celular total da epiderme e são capazes de capturar e processar o antígeno no interior da pele, migrando para o linfonodo a fim de fazer a apresentação aos linfócitos T (MONTAGNA e PARAKKAL, 1974). É possível que, através destas propriedades imunes, as células de Langerhans participem não somente nas reações de sensibilização das dermatites de contato, mas também, da rejeição de enxertos, na proteção de infecções virais e, também, na eliminação de clones de células epiteliais neoplásicas originadas na pele.

Por fim, a lâmina basal é composta predominantemente de laminina, fibronectina e colágeno tipo IV, e separa a epiderme da derme.

### *A derme*

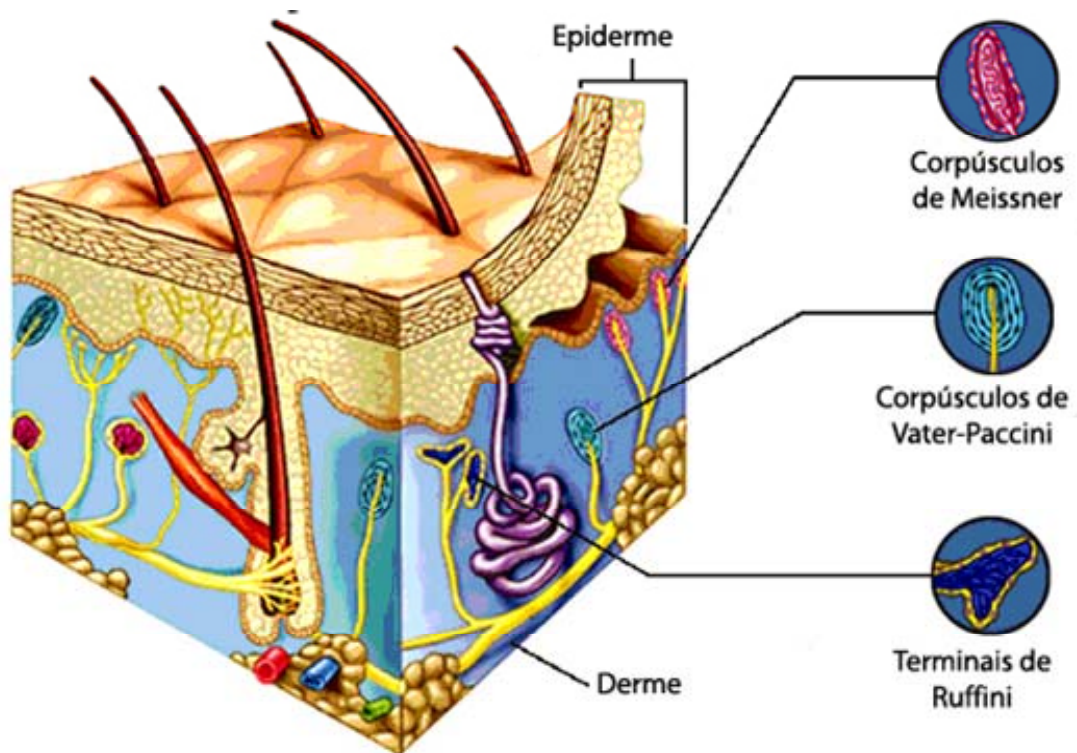
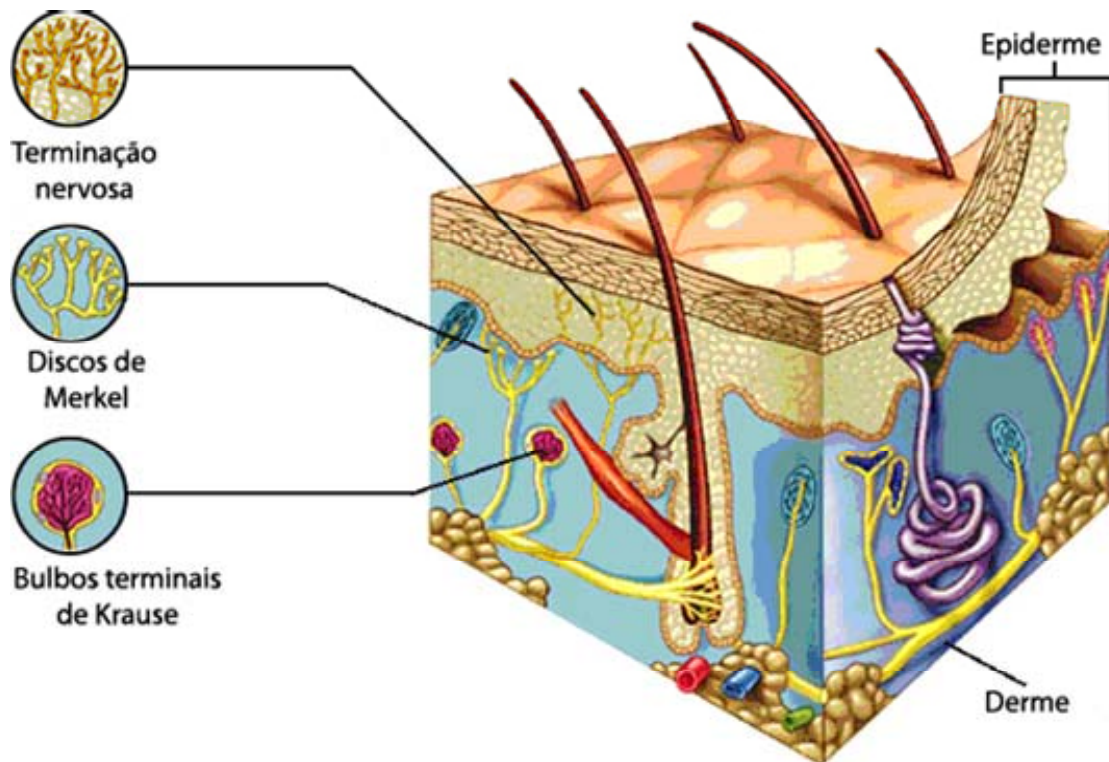
A derme tem espessura variável ao longo do organismo e é formada por um tecido conjuntivo rico em mucopolissacarídeos e fibras colágenas, elásticas e reticulares. A derme aloja estruturas anexas da pele - glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos. Encontram-se ainda, suas células características, ou seja, fibroblastos, histiócitos, mastócitos, células mesenquimais indiferenciadas e as células de origem sangüínea, leucócitos e plasmócitos. Em quantidades variáveis também se encontram na derme vasos sangüíneos, linfáticos e estruturas nervosas. Dentre estas, o principal tipo celular encontrado na derme são os fibroblastos os quais são capazes de migrar através do tecido e são responsáveis pela síntese e degradação de proteínas de tecido conectivo fibroso e não fibroso. Além disso, os mesmos fibroblastos também são capazes de sintetizar mais de um tipo de proteína simultaneamente (por exemplo, colágeno e elastina). Em condições de inflamação e cicatrização hipertrófica, há um aumento da proliferação e da atividade dos fibroblastos e estes por sua vez, respondem a mediadores imunes, incluindo IL-1 $\alpha$  e IL -1 $\beta$ , pelo aumento da síntese de fator de

crescimento de queratinócitos, fator de crescimento hepático, IL-1 $\alpha$ , IL -1 $\beta$  e IL-8 (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

### *A hipoderme*

A hipoderme, ou panículo adiposo, é a camada mais profunda da pele, de espessura variável, composta exclusivamente por tecido adiposo. Relaciona-se em sua porção superior, com a derme profunda, constituindo-se a junção dermo-hipodérmica. Funcionalmente, a hipoderme além de depósito nutritivo de reserva, participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a motilidade da pele em relação às estruturas adjacentes (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).

Toda a superfície cutânea está provida de terminações nervosas capazes de captar estímulos térmicos, mecânicos ou dolorosos. Essas terminações nervosas ou receptores cutâneos são especializados na recepção de estímulos específicos. Nas regiões da pele providas de pêlo, existem terminações nervosas específicas nos folículos capilares e outras chamadas terminais ou receptores de Ruffini (FIGURA 2). As primeiras, formadas por axônios que envolvem o folículo piloso, captam as forças mecânicas aplicadas contra o pêlo. Os terminais de Ruffini, com sua forma ramificada, são receptores térmicos de calor. Na pele desprovida de pêlo e também na que está coberta por ele, encontram-se ainda cinco tipos de receptores comuns: Corpúsculos de Vater –Paccini (receptores de estímulos táteis e vibração), discos de Merkel (receptores de sensibilidade tátil e pressão), terminações nervosas livres (receptores sensíveis aos estímulos mecânicos, térmicos e nociceptivos), corpúsculos de Meissner (receptores específicos para a sensibilização tátil), bulbos terminais de Krause (receptores térmicos de frio) (FIGURA 2) (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).



**FIGURA 2:** Esquema simplificado de uma secção transversal da epiderme, mostrando os receptores cutâneos. Fonte: Adaptado de CUCÉ e NETO et al., 2001 e SAMPAIO e RIVITTI, 2000.

Graças à arquitetura e às propriedades físicas, químicas e biológicas de suas várias estruturas, a pele, como membrana envolvente e isolante, é um órgão capacitado à execução de múltiplas funções como a de proteção à agentes externos de qualquer natureza e, ao mesmo tempo, ao impedimento de perda de água, eletrólitos e outras substâncias do meio interno. Além disso, tem a função de termorregulação, ou seja, graças à sudorese, constrição e dilatação da rede vascular cutânea, a pele processa o controle homeostático da temperatura orgânica.

A secreção sebácea é importante para a manutenção eutrófica da própria pele, particularmente da camada córnea, evitando a perda de água. Além disso, o *sebum* tem propriedades antimicrobianas e contém substâncias precursoras da vitamina D. Quanto às glândulas sudoríparas, a eliminação de restos metabólicos não tem valor como função excretora (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). Em adição, a pele é o maior componente periférico do sistema imune e inicia a resposta imune primária contra antígenos (Ag) exógenos. Durante a evolução, a pele desenvolveu um ambiente imunológico específico conhecido como tecido linfóide associado à pele (Skin Associated Lymphoid Tissue – SALT). O SALT consiste principalmente em células de Langerhans e células dérmicas apresentadoras de antígenos (que circulam entre a pele e os linfonodos), queratinócitos e células endoteliais (que produzem citocinas e reguladores de crescimento) e linfócitos (que extravasam da circulação para a pele). Todos esses componentes atuam em conjunto para otimizar a detecção do antígeno (DEBENEDICTIS et al., 2001).

A pele por ser o maior órgão do corpo humano e, por ser a interface com o meio externo, é constantemente sujeita a lesões e invasão de patógenos que podem gerar diversos processos inflamatórios. A resposta inflamatória cutânea é iniciada para promover a resolução de um desequilíbrio da homeostase da pele por isso, juntamente com sinais inflamatórios (vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, quimiotaxia, edema, entre outros) são gerados mecanismos para inibir este processo, como por exemplo, as lipoxinas que agem sobre os leucócitos inibindo a quimiotaxia, a adesão celular e sua transmigração através das células endoteliais, bem como o aumento da permeabilidade vascular mediado pelas células polimorfonucleares (GILROY, et al., 2004). A falha destes mecanismos endógenos que controlam a inflamação pode fazer com que este processo,

inicialmente resolutivo, desregule a homeostase do órgão, predispondo o mesmo a desenvolver processos inflamatórios crônicos (DEBENEDICTIS et al., 2001). É importante reconhecer a composição normal da pele em termos de estrutura e função a fim de distinguir variações e diagnosticar doenças da pele para que se possa realizar um tratamento adequado. Essas variações se manifestam primeiramente através da espessura, composição e densidade dos anexos cutâneos, e, em alguns casos de diferenciação bioquímica (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

## 1.2 FISIOPATOLOGIA CUTÂNEA

A pele, como qualquer outro órgão, é passível de ser atingida pelos fenômenos patológicos básicos que podem ocorrer isoladamente ou em associação, resultando em grande número de variações que constituem os fundamentos clínico-patológicos das dermatoses (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). Como dito anteriormente, a pele é o maior componente periférico do sistema imune na qual fazem parte os componentes da imunidade inata e adaptativa (SCHILLER et al., 2006). Ambos participam, de maneira diferente, na defesa do organismo contra a invasão de microorganismos que estão constantemente presentes no ambiente.

A imunidade inata é a primeira linha de defesa capaz de emitir uma resposta rápida frente aos invasores, reagindo de forma similar à repetidas exposições (DEBENEDICTIS et al., 2001). Deste modo, a imunidade inata é o conjunto de elementos preexistentes no organismo que lhe permite lidar com agressões internas e externas, que não depende de reconhecimento baseado em moléculas com regiões variáveis. Nesse contexto, as células mais importantes são:

1. **Células *natural killer* (NK):** São células linfóides, não –T, não –B especializadas na destruição de células-alvo. As células NK atacam qualquer célula, a não ser que expressem moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, pois essas moléculas estão presentes

na maioria das células do hospedeiro de modo que as células NK evitam lesar as células do hospedeiro.

**2. Macrófagos:** São células que fagocitam elementos estranhos do organismo. Expressam numerosos receptores em sua superfície além de sintetizar e produzir substâncias biologicamente ativas (IL-1; Fator de Necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$  fatores de coagulação, entre outros). Seu papel fundamental está ligado a imunidade, por meio de sua interação com os linfócitos.

**3. granulócitos:**

a. *neutrófilos*: São células polimorfonucleares capazes de englobar e destruir microorganismos. Além disso, constituem as primeiras células a alcançar a área do sítio inflamatório (GIEMBYCZ e LINDSAY et al., 1999 e ERGESTEN, 2001)

b. *eosinófilos*: Além da capacidade larvicida, desempenham ainda um papel regulatório, modulando as reações de hipersensibilidade causada pelas liberações de compostos provenientes dos mastócitos, particularmente a histamina e heparina, e também de mediadores derivados do ácido araquidônico (GIEMBYCZ e LINDSAY et al., 1999 e ERGESTEN, 2001)

c. *mastócitos*: São células do tecido conjuntivo que participam do sistema imune. Estão envolvidas em processos como asma, alergia e inflamação, devido à liberação de mediadores químicos (aminas biogênicas, TNF- $\alpha$ , produtos derivados do ácido araquidônico, interleucinas e outros fatores) após sua desgranulação.

Ao contrário da imunidade inata, a imunidade adaptativa é uma resposta mais lenta e é mediada por células T e B, bem como pelas células apresentadoras de antígenos (APCs - do inglês, *antigen presenting cells*) (SCHILLER et al., 2006). É caracterizada por distinguir macromoléculas e também por sua habilidade de memorização, produzindo uma resposta secundária exacerbada frente à re-exposição ao antígeno. Essa imunidade adquirida oferece uma extraordinária capacidade de distinguir patógenos e macromoléculas através

de receptores de células T e células B altamente específicas. Fazem parte da imunidade adaptativa:

- Células apresentadoras de antígenos: São células essenciais, capazes de apresentar antígenos aos linfócitos T<sub>helper</sub> (Th), desempenhando sua função “auxiliadora” na resposta imune adaptativa. Consistem nos macrófagos, células de Langherans e outras células dendríticas da derme. Essas células fagocitam e/ou endocitam os antígenos exógenos, os processam e os expõem na sua superfície como peptídeos antigênicos associados às moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – do inglês, *major histocompatibility complex*).

- Células B são responsáveis pela produção de anticorpos, isto é, pela resposta imune humoral. Os anticorpos produzidos por estas células ligam-se na superfície de certos tipos de bactérias e atraem células específicas do sistema imune e proteínas do sangue, digerindo as bactérias e células estranhas. Anticorpos também podem ser chamados de gamaglobulinas ou imunoglobulinas (Ig) e constituem-se em duas regiões: um sítio de reconhecimento de antígenos específicos e outra região que ativa os mecanismos de defesa do hospedeiro (AZULAY e AZULAY et al., 1997).

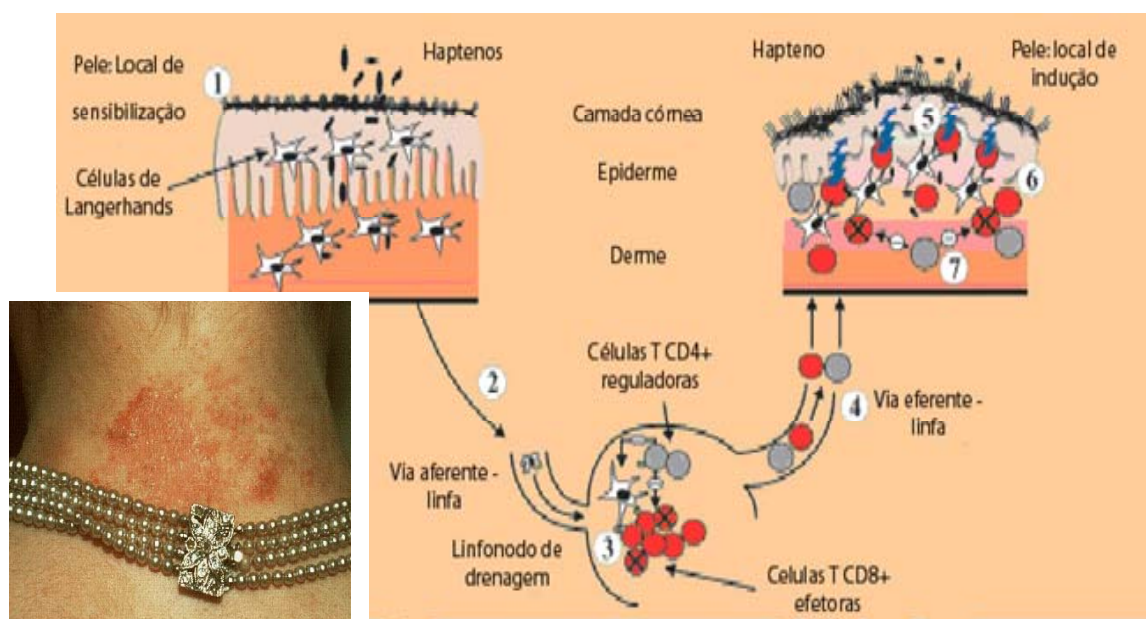
- Células T: Importante na fase de indução na resposta imunológica e responsável pelas reações imunológicas mediadas por células. Consistem nas células T citotóxicas ou CD8<sup>+</sup> (são eficazes essencialmente contra vírus e células tumorais; são caracterizados também por liberar TNF- $\alpha$  e interferon (IFN)- $\gamma$  que atuam sinergicamente) e em Th ou CD4<sup>+</sup> (quando estimulados pelo antígeno através do MHC), liberam IL-2 e IFN- $\gamma$  principalmente e IL-4, IL-5 e IL-10. Os linfócitos Th podem ser de dois tipos principais: os linfócitos Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> sendo o que os distingue é o padrão de citocinas que cada um produz. Th<sub>1</sub> liberam IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  (que parecem estar envolvidas, principalmente nas respostas imunes inflamatórias) e Th<sub>2</sub> secretam IL-4, IL-5 e IL-10 (que estão mais envolvidas com o auxílio para a produção de certas classes de imunoglobinas pelos linfócitos B (AZULAY e AZULAY et al., 1997).

Os processos anatomopatológicos que ocorrem na pele são: degenerações, alterações metabólicas, proliferações, malformações disfunções e inflamações. As degenerações são características de determinadas afecções, tais como a degeneração balonzante própria das viroses, a degeneração fibrinóide própria das colagenases e a degeneração granular, também chamada de hiperqueratose epidermolítica, que ocorre em algumas doenças congênitas nas quais há alterações da queratinização. Como a pele está estreitamente ligada aos demais sistemas orgânicos, sofre alterações decorrentes de anormalidades do metabolismo e, como resposta reflexa, alterações cutâneas extensas são capazes de produzir alterações metabólicas. Por exemplo, a doença de Hartnup ocorre devido ao distúrbio do metabolismo do triptofano e se expressa na pele através de manifestações de fotosensibilidade (SAMPAIO e RIVITTI, 2000)

As proliferações compreendem as hiperplasias pseudo-epiteliomatosas e as neoplasias. As primeiras são respostas epiteliais hiperplásicas a processos inflamatórios, havendo intensa proliferação das camadas epidérmicas sem atipias celulares e, diferentemente das neoplasias epiteliais, há um retorno a normalidade com eliminação do processo desencadeante. Por outro lado, as neoplasias são proliferações constituídas por células, não somente em número excessivo, mas também com alterações de maturação e, além disso, características morfofuncionais anômalas. Podem ser benignas ou malignas, de acordo com sua capacidade de invadir e destruir tecidos normais e gerar metástases. As malformações consistem em excessos ou deficiências de um ou vários constituintes normais da pele e são, em geral, designados de nevos. Nevo epitelial, nevo sebáceo, nevo piloso são exemplos de malformações por excesso de seus constituintes (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).

Os eczemas são dermatites caracterizadas pela presença de eritema, edema, infiltração, vesiculação, secreção, formação de crostas e escamas. Essas lesões se sucedem e se associam, formando os aspectos multiformes das dermatites e ao lado dessas lesões há um sintoma constante, moderado ou intenso, que é o prurido. Este é causado pela liberação de substâncias que excitam as terminações nervosas cutâneas, sendo os estímulos levados ao córtex cerebral (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).

Dentre essas patologias cutâneas a dermatite de contato alérgica (DCA), também conhecida como hipersensibilidade de contato, é umas das dermatoses inflamatórias mais freqüentes, sendo caracterizada por eritema, pápula e vesículas, seguida por ressecamento e descamação (FIGURA 3). A DCA é induzida pelo contato de substâncias químicas não protéicas denominadas de haptenos (por exemplo, níquel, cromo, dinitrofluorbenzeno e oxazolona) e corresponde a hipersensibilidade cutânea tardia do tipo IV, mediada por células T hapteno-específicas.



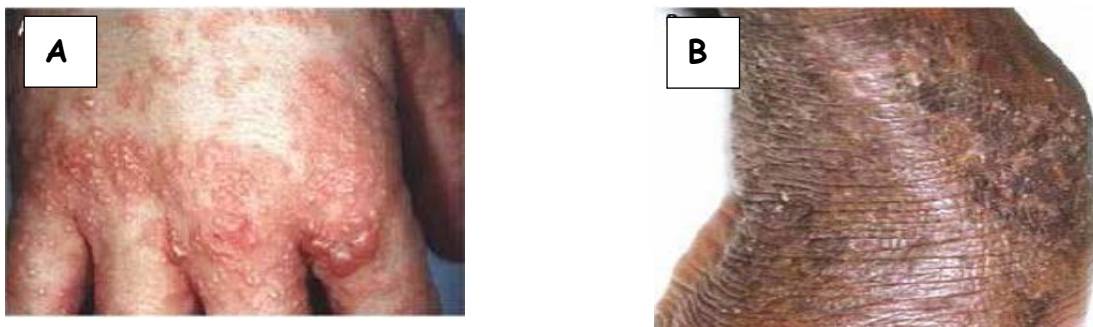
**Figura 3: Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica (DCA) Fase de sensibilização (fase aferente).** Os haptenos penetram na epiderme (1) e são captados pelas células epidérmicas incluindo as células de Langerhans que migram para os linfonodos de drenagem (2), onde apresentam peptídeos conjugados a haptenos às células T CD8+ efetoras e às T CD4+ reguladoras negativas (3). Precursores de células T específicos expandem-se clonalmente nos linfonodos de drenagem, recirculam pelo sangue e migram aos tecidos, inclusive para a pele (4). *Fase de indução (fase de provocação, fase eferente).* Quando o mesmo hapteno é aplicado sobre a pele, ele é captado pelas células epidérmicas, inclusive as CD e os queratinócitos (5), que apresentam peptídeos conjugados a haptenos a células T específicas. A ativação de CD8+ induz a apoptose dos queratinócitos e a produção de citocinas e quimiocinas pelas células cutâneas (6),

o que leva ao recrutamento de leucócitos do sangue para a pele. As células T CD4<sup>+</sup> podem bloquear a ativação/expansão dos efetores CD8<sup>+</sup> nos linfonodos durante a sensibilização, e na pele durante a fase de indução da hipersensibilidade de contato (3 e 7). Adaptado de Hennino et al. (2005).

Durante a fase de sensibilização, tanto os precursores de células CD4<sup>+</sup> (molécula característica dos linfócitos Th, ativada apenas por células apresentadoras de antígenos que expressam na sua superfície os antígenos de MHC de classe II), quanto os de CD8<sup>+</sup> (molécula característica dos linfócitos T supressores ou citotóxico, ativada apenas por células apresentadoras de antígeno que expressam MHC de classe I) são ativados nos linfonodos de drenagem através da apresentação de peptídeos conjugados à haptenos pelas células dendríticas da pele. A subsequente exposição da pele ao hapteno em qualquer local do organismo induz o recrutamento e ativação de células T específicas no local de provocação, levando a apoptose dos queratinócitos, recrutamento de células inflamatórias e desenvolvimento de sintomas clínico como prurido, eritema, edema e descamação cutânea (HENNINO et al., 2005).

Outra doença inflamatória da pele é a dermatite atópica (DA), uma doença inflamatória crônica associada com hiperreatividade cutânea a estímulos normalmente inócuos a indivíduos não-atópicos (FIGURA 4). É caracterizada por um eritema mal definido com presença de edema, vesículas com exsudato em estágios agudos e aumento da espessura da pele (liquenfação) (WILLIAMS, 2005). É uma manifestação eczematosa peculiar frequentemente associada à asma e/ou rinite alérgica e, eventualmente, urticária. Vários estudos indicam que a dermatite atópica apresenta uma etiologia complexa, com participação de componentes genéticos e ativação de diferentes vias imunológicas e inflamatórias. O principal sintoma é o prurido, que pode começar antes mesmo das lesões cutâneas se manifestarem. Na infância, as lesões são avermelhadas e descamativas. Podem atingir a face, tronco e membros. Com o ato de coçar, tornam-se escoriadas e podem sofrer infecção secundária. Nos adolescentes e adultos, as lesões localizam-se preferencialmente nas áreas de dobras da pele, como a região posterior dos joelhos, pescoço e dobras dos braços (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). A pele destes locais torna-se mais grossa, áspera e escurecida. O fenótipo clínico que caracteriza essa patologia é um produto de complexas

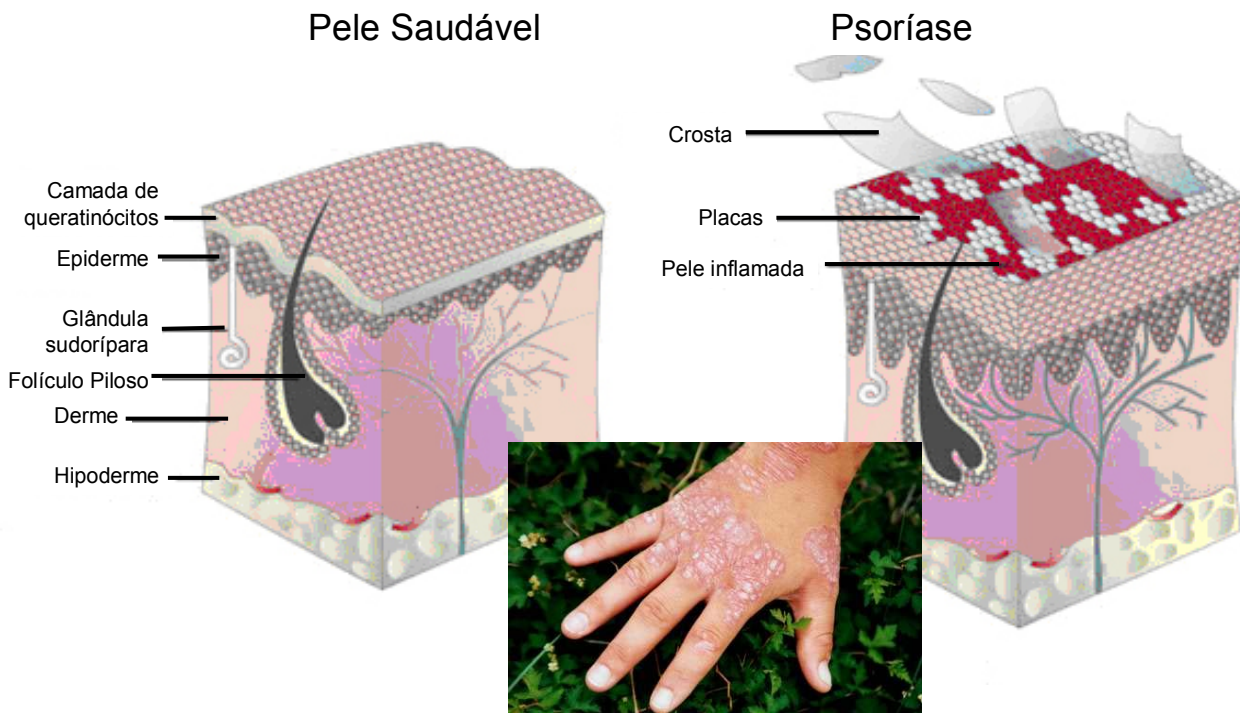
interações entre predisposição a genes, o organismo do doente, defeitos na função de barreira da pele e respostas imunológicas locais e sistêmicas. Vários estudos têm sido realizados a fim de compreender o papel destes diferentes fatores na patogênese da DA devido à alta incidência desta doença que aparece normalmente durante a infância, mas pode persistir ou aparecer na fase adulta. A prevalência desta patologia é de 10-20% nas crianças e 1-3% nos adultos e está aumentando nas últimas três décadas (LEUNG et al., 2004).



**FIGURA 4:** Dermatite atópica. Painel A mostra dermatite atópica aguda com intenso eritema e presença de vesículas. Painel B mostra dermatite atópica crônica com liquefação e crosta na parte dianteira do tornozelo (WILLIANS et al., 2005).

A psoríase é uma doença cutânea na qual ocorre uma resposta inflamatória na pele que afeta aproximadamente 2% da população. É caracterizada por lesões eritemato-escamosas, ocorrendo igualmente em ambos os sexos (FIGURA 5). Anualmente, 1,5 milhões de pacientes nos Estados Unidos procuram o médico devido à psoríase com um gasto estimado entre 1,6-3,2 bilhões de dólares. De acordo com a Fundação Nacional de Psoríase dos Estados Unidos, existem 260.000 novos casos sendo relatados a cada ano, com uma idade média de 28 anos para o aparecimento da doença. Além disso, aproximadamente 5-10% dos pacientes desenvolvem artrite psoriática, com inflamação e edema nas mãos, pés e articulações, sendo a doença usualmente recorrente e muito debilitante. Tratamentos tópicos antigos, como os emolientes e outros, são cosmeticamente inaceitáveis e possuem baixa eficácia. Enquanto que

a terapia sistêmica, como metotrexato (antimetabólico), ciclosporina (imunossupressor) e acitretina (retinóide), possuem significativos efeitos colaterais. Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de novas terapias sistêmicas e tópicas bem como o entendimento das causas que levam ao aparecimento desta doença (DISEPIO, et al., 1999).



**FIGURA 5:** Esquema simplificado da psoríase vulgar. É caracterizado por erupção eritemato-escamosa apresentando aumento da camada Malphigiana (acantose) e presença de células nucleadas na camada córnea (paraqueratose). As lesões iniciam-se com pápulas avermelhadas, pequenas, superadas por finas escamas e progredindo para manchas ou placas que medem vários centímetros (adaptado de SAMPAIO e RIVITTI, 2000 e AZULAY e AZULAY, 1997).

Existe um grande número de doenças caracterizadas por um processo inflamatório, com ou sem um componente imunológico. Assim, mesmo pertencendo ao mesmo grupo de patologias (inflamatórias), os sintomas e os mecanismos envolvidos com sua patogênese são muito diferentes. Desta forma, existem patologias iniciadas por um processo alérgico ou irritativo que podem transcorrer por curto ou longo prazo. Deste modo, pesquisar doenças inflamatórias cutâneas não necessariamente significa estudar patologias com mesmo perfil e mesmo tipo de tratamento (GOODMAN e GILMAN, 2006).

Todas as proteínas geradas durante o processo inflamatório são consideradas alvos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos e têm causado grande interesse para descoberta de uma nova geração de antiinflamatórios para tratamento de patologias como artrite reumatóide, asma, esclerose múltipla e psoríase (BHAGWAT et al., 1999). As patologias dermatológicas, dermatites, eczemas e psoríase, são lesões cutâneas que dão um aspecto desagradável à pele, o que perturba significativamente os doentes, obrigando-os a tratamentos prolongados e diversos. São múltiplos os recursos terapêuticos para estas situações. No entanto a exigência de terapêutica persistente, prolongada e distinta não contribui para um tratamento eficaz e de boa adesão dos doentes. Estas dificuldades são acrescidas pelas ondas de recorrência que contribuem para o desenvolvimento de situações de ansiedade, os quais podem, por sua vez, ser responsáveis por exacerbações das lesões.

### 1.3 INFLAMAÇÕES CUTÂNEAS

A pele é a primeira região onde agentes invasores – bactérias, vírus, fungos, agentes químicos e físicos agredem. A inflamação compreende um conjunto de respostas tissulares, envolvendo principalmente vasos sangüíneos e tecidos conectivos perivasculares. É produzida e mantida pela interação de vários tipos celulares residentes como terminações nervosas, queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais e macrófagos, além de células que migram para o tecido inflamado como os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos, e linfócitos). Assim, vários mediadores pró-inflamatórios solúveis como

neuropeptídeos, metabólitos do ácido araquidônico, monoaminas e citocinas são liberados (BHAGWAT et al., 1999).

Quando os agentes agressores são encontrados dentro do organismo, como resultado de uma infecção, ou de uma lesão ou ainda por contato, o sistema imune, se intacto, mobilizará agentes para o sítio da infecção iniciando a inflamação. E este processo é iniciado e conduzido por mediadores de origem celular e plasmática que, atuando localmente, vão promover os sinais característicos da resposta inflamatória, ou seja, dor, calor, rubor e tumor (edema), acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado. Clinicamente, a reação inflamatória manifesta-se de maneira estereotipada e independente da natureza do estímulo, podendo ocorrer pequenas variações dependentes do tecido ou órgão afetado, e da coexistência de estados patológicos (ROCHA e SILVA, 1978; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985). Os vários mediadores inflamatórios normalmente atuam no sentido de restringir as conseqüências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente os sinais locais e os principais mediadores envolvidos na fase alérgica aguda são a histamina dos mastócitos e a imunoglobulina E (IgE) (FREINKEL e WOODLEY, 2000). Porém, dependendo da persistência e/ou intensidade da lesão, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticóides, alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de metais como ferro, cobre e zinco. Esta resposta sistêmica é denominada resposta de fase aguda (RFA) (revisado por STADNYK e GAULDIE, 1991).

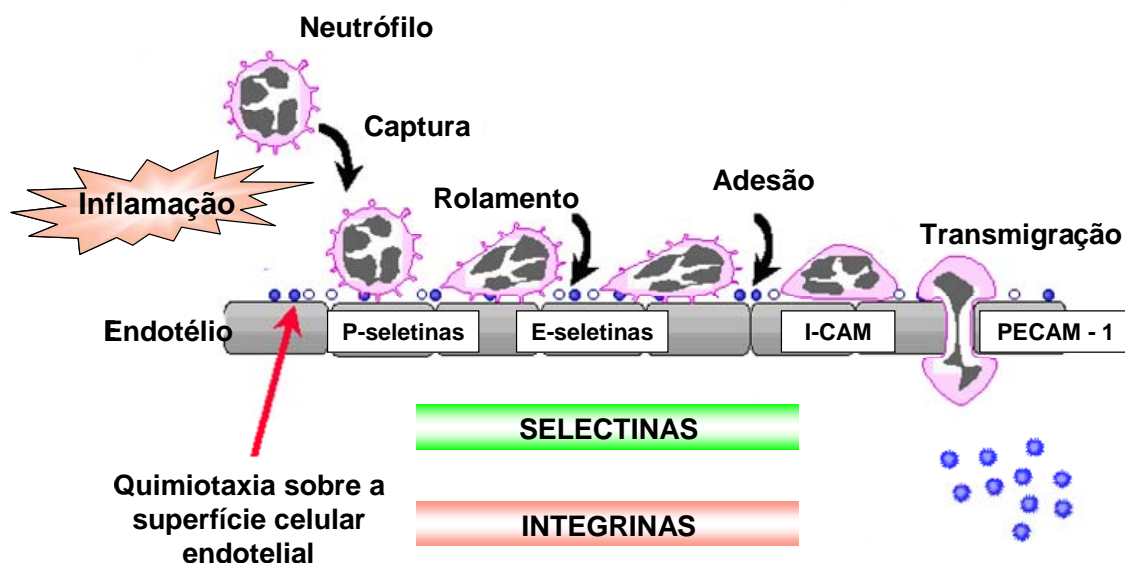
Um dos primeiros sinais da inflamação é a formação do edema. O edema é causado pelo fluxo transvascular de um fluido rico em proteínas (plasma) do compartimento intravascular para o interstício como resultado da ação de vários mediadores como histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do sistema complemento, substância P e fator de ativação de plaquetas (PAF) (FRIEDL et al., 1989; DENZLINGER et al., 1985). Esses fatores alteram as funções de barreira de pequenos vasos sangüíneos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas tanto para água quanto para proteínas (DEMLING et al., 1984 e DEMLING et al., 1982). Ao mesmo tempo, a pressão hidrostática dos capilares é

aumentada no local do ferimento como resultado da vasodilatação local. Esta vasodilatação local ocorre principalmente devido a geração de metabólitos do ácido araquidônico particularmente prostaglandinas  $E_2$  e  $I_2$  (por macrófagos e células endoteliais ativadas) e por óxido nítrico (gerado pelas células endoteliais em resposta à histamina, bradicinina e substância P). O extravasamento do plasma leva a uma concentração de eritrócitos nos pequenos vasos sanguíneos aumentando assim a viscosidade do sangue. Concomitantemente a perda de proteínas plasmática, também há diminuição da pressão oncótica intravenosa, e esses fatores juntamente com o aumento da permeabilidade vascular e o aumento transitório da pressão hidrostática nos capilares levam à indução do fluxo transvascular de líquido e proteínas para o interstício. A função destas alterações é permitir a chegada de anticorpos e proteínas ao local da lesão a fim de diluir a inflamação. Ainda ocorre no local uma estase sanguínea que impede a disseminação de agentes infecciosos que possam estar presentes no local (SHERWOOD et al., 2004).

A migração de leucócitos para os sítios inflamatórios representa um importante mecanismo na defesa do organismo contra agentes agressores. Dentre as células residentes em tecidos, órgãos e cavidades, os macrófagos ocupam papel central na defesa contra agentes invasores, por sua capacidade de sintetizar diversas substâncias quimiotáticas, tais como: leucotrieno  $B_4$  (LTB<sub>4</sub>) (SAMUELSON 1983; MACMILLIAN e FOSTER, 1988), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (CYBULSKY et al., 1986), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (MING, et al., 1987), interleucina-8 (IL-8) (RIBEIRO et al., 1991; SMITH et al., 1991), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (RIBEIRO et al., 1990), fator quimiotático para neutrófilos derivado de macrófagos (MNCF) (SOUZA e FERREIRA, 1985; CUNHA e FERREIRA, 1986; CUNHA et al., 1986; DIAS-BARUFFI et al., 1993) e o C5a; (YANCEY, 1988). A quimiotaxia estimulada por citocinas comanda a adesão dos leucócitos ao endotélio e sua migração para fora da luz vascular (diapedese) em direção ao foco inflamatório, orientada por um gradiente de concentrações crescentes dessas substâncias (HARLAN, 1985; WILKINSON, 1994).

A fase inicial da adesão de leucócitos ao endotélio, chamada de “rolagem”, envolve a expressão de selectinas (L-selectinas em neutrófilos, E-selectinas e P-selectinas em células endoteliais) (FIGURA 6). No entanto, a interação entre

essas moléculas de adesão não é forte o suficiente para que leucócitos possam migrar para fora da luz vascular. A adesão firme ao endotélio requer a ativação de membros da família das integrinas leucocitárias (CD11a/CD18 ou LFA-1, CD11b/CD18 ou MAC-1 e CD11c/CD18 ou gp150,95) que interagem com as moléculas de adesão ICAM-1 e ICAM-2, membros da família das imunoglobulinas, encontradas na superfície de células endoteliais (KISHIMOTO, et al., 1989a; KISHIMOTO et al., 1989b; LARSON e SPRINGER, 1990; SPRINGER, 1990; ALBELDA e BUCK, 1990; CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993; ALBELDA et al., 1994). O aumento da adesão leucocitária durante a inflamação envolve interações específicas entre moléculas de adesão complementares presentes nas superfícies dos leucócitos e das células endoteliais (CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993). Essas moléculas são diferencialmente expressas e reguladas, obedecendo a uma ordem fisiológica que permite a eficiência do reconhecimento não apenas do tipo célula/célula, ou seja, a interação do neutrófilo com o endotélio, como também em eventos do tipo célula-matriz extracelular.



**FIGURA 6: Mecanismo simplificado da migração celular.** Interação entre leucócitos e a célula endotelial durante alteração vascular. O passo inicial do recrutamento de leucócitos envolve a ativação de células endoteliais e expressão de selectinas no endotélio. Os leucócitos tornam-se ativados e ocorre o processo de rolagem via interação com P-selectina e E-selectina expressas no endotélio. Uma forte adesão dos leucócitos envolve sua interação com ICAM-1. Finalmente, a migração através do endotélio é mediada via PCAM-1 com conseqüente extravasamento celular (Adaptado de SHERWOOD et al., 2004)

Estes fatores demonstram que a migração de neutrófilos é um processo multimediado, no qual vários mediadores liberados no foco inflamatório regulam de alguma maneira a migração de neutrófilos e demais leucócitos (SHERWOOD et al., 2004)

Os fenômenos inflamatórios agudos na pele produzem dermatites agudas com conseqüências epidérmicas de espongiose, vesiculação intra-epidérmica, exocitose e exsudação, que são características dos eczemas agudos (SAMPAIO e RIVITTI et al., 2000). Gradativamente, os fenômenos inflamatórios diminuem em intensidade, estabelecendo-se a fase subaguda e crônica da inflamação. A fase

crônica da inflamação da pele é mediada por células T e citocinas na qual a dermatite repercute diferentemente sobre a camada germinativa, produzindo-se acantose (aumento em espessura da camada de Malpighi), hiperqueratose (aumento excessivo da camada de Malpighi) e paraqueratose (alteração da queratinização com presença de núcleos na camada córnea e diminuição ou ausência da camada granulosa), que caracterizam dermatites liquenóides, psoriasiforme e eczemas crônicos (SAMPAIO e RIVITTI et al., 2000; FREINKEL e WOODLEY, 2000).

Em muitos casos de doenças da pele, o prurido aparece como um importante sintoma. Junto à dor é um importante sintoma de problemas sistêmicos. Tanto a nocicepção quanto o prurido são experiências sensoriais desagradáveis, no entanto o padrão de respostas é diferente – enquanto que dor exerce uma resposta de retirada o prurido leva ao reflexo de coçar. Entretanto, ambos levam a uma baixa qualidade de vida (YOSIPOVITCH et al., 2003). Muitos trabalhos sugerem que baixos níveis de ativação de nociceptores podem iniciar a sensação de prurido ao contrário de quando os nociceptores são intensamente ativados provocando sensação de nocicepção. Essa correlação, no entanto, não explica por que baixas concentrações de algogênios não provocam prurido, mas intensa dor, e por que altas concentrações de substâncias pruriceptivas não causa dor, mas intenso prurido. De acordo com esse resultado, a frequência de disparos nos nociceptores não avalia a diferenciação entre nocicepção e prurido. Deste modo, supõe-se que agentes pruritogênicos excitam preferencialmente certos subgrupos de nociceptores causando a sensação de prurido (SCHMELZ, 2002).

O prurido é uma sensação desagradável que aparece em muitas doenças de pele como, por exemplo, na dermatite de contato, dermatite atópica e urticária. Nessas doenças, a coceira provocada pelo prurido agrava as lesões da pele e a evolução da dermatite (UEDA et al., 2006). Por esta razão, considera-se que uma das estratégias mais eficazes para tentar impedir ou diminuir a gravidade das lesões da pele e promover uma melhora na qualidade de vida dos pacientes com dermatite atópica é reduzir o prurido e a coceira (CAROLINE, 1999). Estímulos que causa o prurido levam a duas respostas distintas: a primeira bem localizada próxima ao estímulo e de rápida duração e uma segunda que abrange uma área

de localização difusa ao redor do sítio e que responde com prurido intenso quando exposto a um estímulo mínimo (YOSIPOVICH et al., 2003).

Twycross et. al. (2003) propuseram quatro classificações clínicas de prurido para melhor compreender sua origem:

*Prurido pruriceptivo:* O prurido se origina na pele, em decorrência de uma inflamação, pele seca ou outra lesão cutânea. É transmitido via fibras C. Surge em casos de escabiose, urticária e reações de picada de inseto;

*Prurido neuropático:* O prurido deriva de doenças localizadas em qualquer ponto de uma via aferente. Aparece na neuropatia pós herpética, na qual o prurido é frequentemente associado com esclerose múltipla e tumor cerebral.

*Prurido neurogênico:* O prurido tem origem no sistema nervoso central, mas sem evidências de patologias neurais, como na colestase, que é uma doença na qual há redução do fluxo biliar causando icterícia e intenso prurido. Nesse caso o prurido é derivado da ação de neuropeptídeos opióides.

*Prurido psicogênico:* O prurido psicogênico aparece em estágios avançados de parasitofobia.

Estudos recentes têm investigado os possíveis mediadores do prurido, tais como a histamina, acetilcolina, bradicinina, neuropeptídeos, PGs, serotonina, entre outros, muitos destes são também os principais mediadores do processo inflamatório (STÄNDER et al., 2003).

A histamina é um dos mediadores relatados que induzem prurido em humanos, portanto também é utilizado como agente prurigênico em modelos experimentais de prurido. Juntamente com a liberação de histamina pelos mastócitos e queratinócitos há também liberação de neuropeptídeos, pelos nociceptores, responsáveis pela vasodilatação, tais como, substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), na qual, via reflexos axonais, induzem eritema ao redor do local de aplicação. Em adição, quando a SP é aplicada por via intradérmica em altas concentrações, ocorre a degranulação de mastócitos provocando a sensação de prurido (HÄNGERMARK et al., 1978). Muitos estudos sustentam essa hipótese referindo que a histamina regula a liberação de SP via receptor pré-juncional H<sub>3</sub> localizados sobre os terminais periféricos dos nervos sensoriais (OHKUBO et al., 1995). Baixas concentrações de SP podem ativar receptores específicos NK1 em mastócitos,

levando à sensibilização dessas células e aumentando a produção de TNF- $\alpha$  (SUZUKI et al., 1999) e estes sensibilizam os terminais nociceptivos. A serotonina por sua vez, é conhecida por excitar fibras C e além de participar no mecanismo da nocicepção, também participa na sensação de prurido e isso deve-se, em parte, ao fato de que o efeito periférico da serotonina seja devido a liberação da histamina dos mastócitos (SCHMELZ et al., 2002).

A bradicinina pertence ao grupo das cininas que se ligam aos receptores do tipo B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Quando injetada na pele, é capaz de induzir nocicepção como também prurido, mediado pelo receptor B<sub>2</sub>, apesar desse efeito estar relacionado à degranulação de mastócitos com conseqüente liberação de histamina (WALKER et al., 1995).

Estudos realizados por Cremer et al. (1995) mostram que o sobrenadante de leucócitos estimulados por um agente prurigênico<sub>1</sub> continha grande quantidade de IL-2 e IL-6. No entanto, não há correlação entre a quantidade de IL-6 e a intensidade do prurido, ao passo que a IL-2 quando administrada por via intradérmica, induz sensação de prurido não somente em pacientes com dermatite atópica, como também em pacientes que fazem tratamento contra câncer (CHI et al., 2001). De fato, a IL-2 potencializa o prurido em modelos experimentais, pela ativação de fibras C cutâneas que são quimiosensíveis a histamina, bradicinina e capsaicina (MARTIN e MURPHY, 1996).

A resposta inflamatória iniciada com o fim de ajustar um desequilíbrio da homeostase seria ideal com um mínimo de modificação vascular e tecidual. Assim, juntamente com estas respostas pró-inflamatórias são gerados estímulos para inibição deste processo. Para tal, células e mediadores inflamatórios trabalham para corrigir distúrbios metabólicos, remover citodentritos resultantes da ação patogênica, refazer estruturas perdidas ou lesadas, a fim de reconstituir a capacidade funcional e a organização anatômica original ou, se os danos teciduais foram extensos, repará-los economicamente por uma cicatriz ou isolá-los dos tecidos ainda sãos (SINGER et al., 1999; GILROY et al., 2004).

A falha de algum destes mecanismos reguladores pode fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, perca o controle e desregule a homeostase do órgão, predispondo o mesmo a desenvolver um processo inflamatório crônico. Uma resposta inflamatória excessiva significa uma manifestação clínica que

necessita de uma intervenção terapêutica (BUCKLE et al., 1997; DEBENEDICTIS et al., 2001).

#### 1.4 FARMACOLOGIA DA INFLAMAÇÃO

A reação inflamatória é um mecanismo de proteção do organismo contra agentes ofensores ou traumas, no entanto, em certas circunstâncias, essa resposta defensiva pode ser dirigida de forma inadequada a substâncias externas ou a tecidos do próprio organismo, podendo então a própria resposta produzir danos. Nestas condições pode ser necessária a utilização de drogas antiinflamatórias. A pesquisa de terapias para o tratamento da inflamação está direcionada a doenças como asma, artrite reumatóide, artrite psoriática, lupus eritematoso sistêmico, doença de Crohn, esclerose múltipla e vasculite sistêmica. No entanto, tais terapias possuem muitos efeitos colaterais. Por exemplo, os antiinflamatórios esteroidais podem causar imunossupressão e impedir a regressão da ferida, enquanto que novas classes de drogas que inibem seletivamente a ciclooxigenase induzida (COX-2) podem reduzir a síntese de prostaciclina e assim reduzir a atividade protetora vascular e conduzir a um aumento do risco de trombose (GILROY et al., 2004). Apesar destes efeitos estas drogas ainda são muito utilizadas na terapêutica de inflamações cutâneas.

Além de sua função fisiológica de substituição no mecanismo das atividades hipotálamo-suprarenais, os corticosteróides têm, cada vez mais, ampla indicação em medicina geral, sobretudo em processos dermatológicos, graças aos seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressivos.

Os glicocorticóides são potentes mediadores antiinflamatórios endógenos que são liberados em poucos minutos na resposta ao estresse e a lesão tecidual como mecanismo de controle da severidade da resposta inflamatória (GILROY, et al., 2004). Os glicocorticóides modulam importantes componentes da resposta de defesa do hospedeiro. Estes hormônios inibem a transcrição de várias citocinas importantes para a resposta imune e/ou inflamatória, como interleucinas,  $TNF\alpha$  e fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos, além de inibirem a ação destas citocinas sobre fatores transcripcionais, como proteína ativadora-1 e o fator

nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). O conjunto destas atividades é considerado como responsável pela atividade imunossupressora dos glicocorticóides (BARNES e ADCOCK, 1993).

Uma das formas pela qual os glicocorticóides inibem a produção de PGs é por meio da indução da síntese de lipocortina (ou anexina-1), que por sua vez atuam inibindo a fosfolipase A<sub>2</sub>, a enzima que converte fosfolípídeos de membrana em ácido araquidônico (FLOWER e ROTHWELL, 1994). Além disto, os glicocorticóides também inibem a expressão gênica desta enzima (NAKANO e ARITA, 1990). O ácido araquidônico é o substrato da enzima COX, que catalisa a síntese de PGH<sub>2</sub>, o precursor comum das PGs, tromboxanas e prostaciclina. Essas PGs têm um papel fundamental em diversos processos fisiológicos e patofisiológicos incluindo inflamação, reprodução, nocicepção e proteção gastrointestinal (GOODWIN, 1989; MARNETT, 1999). A síntese da COX-2 cuja expressão é induzida por estímulos inflamatórios, é inibida por glicocorticóides (GOPPELT-STRUEBE et al., 1989; O'BANION et al., 1992; MASFERRER et al., 1992; MASFERRER et al., 1994), sendo que este efeito dos glicocorticóides não está associado à produção de anexina-1 (NEWMAN et al., 1994). Consequentemente possuem:

1. Ação antiinflamatória: ocorre uma diminuição da vasodilatação e do edema.
2. Ação analgésica: a redução das citocinas e das PGs significa menor sensibilização de terminações nervosas nociceptivas.
3. Diminuição da migração dos leucócitos ao foco inflamatório (inibição da síntese de IL-1, TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, moléculas de adesão, etc).

Outra classe de fármacos semelhantes aos glicocorticóides utilizados na terapêutica dermatológica são os citostáticos e os imunossupressores, que são substâncias que atuam sobre uma das fases da divisão celular, diminuindo ou anulando esse ciclo. Seu uso em dermatologia está indicado em linfomas, melanoma metastático, epiteloma espinocelular metastático, sarcoma de Kaposi, psoríase, pênfingus, lupus eritematoso sistêmico, poliomiosite e eventualmente outras dermatoses (AZULAY e AZULAY, 2001). Dentre estes são utilizados na dermatologia:

- Agentes alquilantes: Indicado para o tratamento de pênfingus vulgar, penfigoide bolhoso, penfigoide cicatricial, penfigoparaneoplásico, piodermia

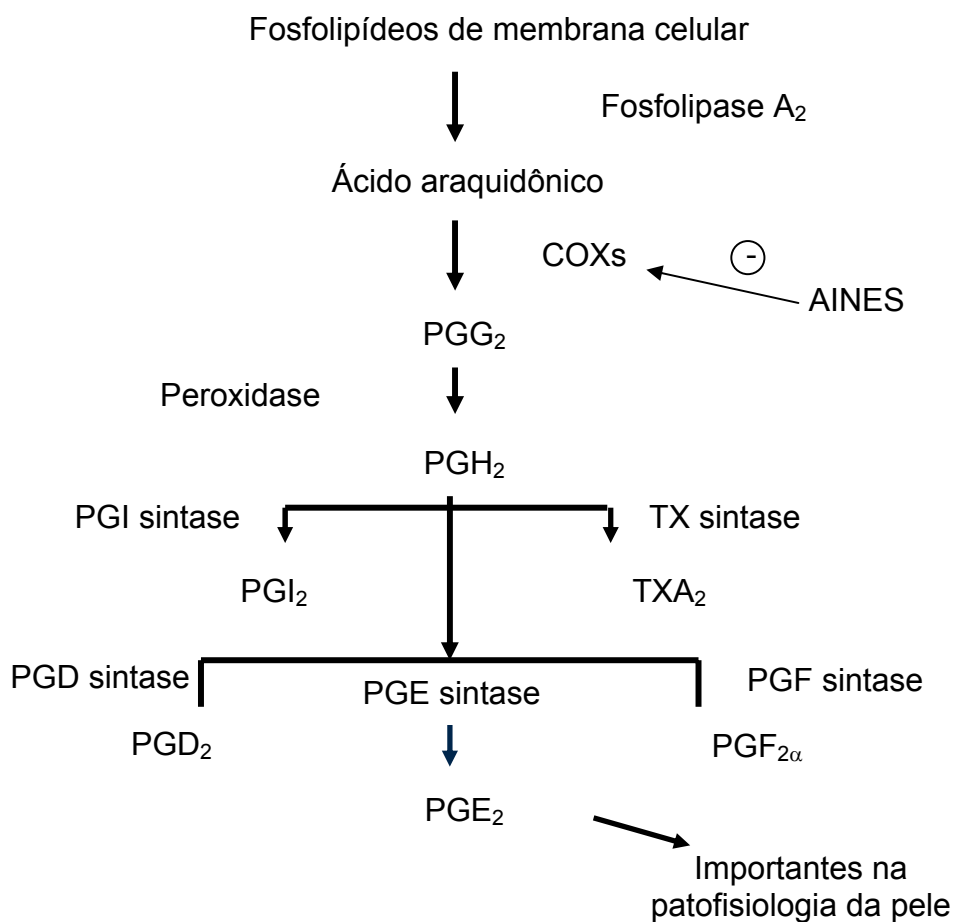
grangrenosa entre outras. Interferem na replicação do DNA à semelhança dos raios ionizantes. Por outro lado podem produzir mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade. Como exemplo destas drogas pode-se citar a ciclofosfamida, o clorambucil e o cloridrato de mecloretamina.

- Antimetabólicos: Utilizados em dermatologia para o tratamento de doenças imunologicamente mediadas, como a psoríase, as doenças bolhosas autoimunes e as vasculites leucocitoclasticas. Agem bloqueando o sistema enzimático de modo a impedir a formação de DNA. Como exemplo destas drogas pode-se citar o Metotrexato, o 5-fluorouracil e a azatioprina.

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) exercem suas atividades analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias por inibirem a síntese de PGs (revisado por VANE & BOTTING, 1998). As PGs participam de diversos processos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo inflamação, reprodução, nocicepção e proteção gastrintestinal. A síntese de PGs (FIGURA 7) inicia-se com a liberação de ácido araquidônico (AA) livre de fosfolipídeos de membrana, e a reação é catalisada pela ativação enzimática da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). A liberação do AA livre é seguida pela conversão em PGG<sub>2</sub> pela ação da ciclooxigenase (COX), e depois em PGH<sub>2</sub> pela atividade da peroxidase. A PGH<sub>2</sub> participa da formação de todas as PGs, incluindo tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e PGI<sub>2</sub>, pela ação de enzimas específicas e individuais a cada uma delas. As PGs estão envolvidas na regulação da contratilidade dos músculos lisos bem como na regulação da pressão sanguínea, agregação plaquetária e ainda como mediadores da dor, edema (vasodilatação) e febre (LEE et al., 2003).

Como citado anteriormente, há dois tipos de COX, denominadas COX-1 e COX-2. A COX-1 é a enzima expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, responsável por várias funções fisiológicas, como proteção da mucosa gástrica, agregação plaquetária, manutenção do fluxo sanguíneo renal e da homeostase vascular (MERLIE et al., 1988). A COX-2, que não está normalmente expressa e pode ser induzida por estímulos incluindo a exposição a fatores de crescimento, citocinas, promotores de tumor carcinogênicos e endotoxinas (JONES et al., 1993). Ou seja, a COX-2 é encontrada em células inflamatórias ativadas, sendo esta a enzima que produz os metabólitos do AA durante uma inflamação (FENG

et al., 1995). A inibição da atividade da COX é realizada pelos AINEs, exercendo efeitos analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios (SIMMONS et al., 2004). Muitos AINEs são inibidores de ambas as isoenzimas, mas os efeitos antiinflamatórios estão relacionados com a inibição da COX-2 e os efeitos colaterais mais conhecidos se devem principalmente à inibição da COX-1 (HAWKEY, 2001).



**FIGURA 7:** Esquema representativo da formação de prostaglandinas pela COX. Adaptado de Chandrasekharan e Simmons (2004) e Lee et al. (2003).

Assim, os AINES possuem três ações principais pela diminuição de síntese de PGs e tromboxanos, com a inibição da COX-2:

1. Ação antiinflamatória: ocorre uma diminuição da vasodilatação e indiretamente do edema, pela redução da síntese de PGs.

2. Efeito analgésico: a redução das PGs significa menor sensibilização de terminações nervosas nociceptivas.

As drogas disponíveis na prática médica atual para o tratamento das doenças da pele, como glicocorticóides, AINEs e imunossupressores, podem tratar com alguma eficácia os processos inflamatórios cutâneos crônicos como a psoríase e a dermatite atópica. No entanto, o tratamento em longo prazo aumenta o risco do aparecimento de efeitos colaterais importantes, como por exemplo, o uso prolongado de glicocorticóides que podem causar osteoporose e ainda diminuir o processo de cicatrização de feridas ou ainda, os AINEs seletivos para COX-2 que reduzem a síntese de prostaciclina e conseqüentemente aumenta o risco para trombose. Em adição, os agentes biológicos, como o anti-TNF, também demonstraram complicações severas quando usado em longo prazo. Estudos clínicos indicaram que os agentes anti-TNF- $\alpha$  não podem ser administrados em pacientes com doenças cardíacas ou ainda com histórico de doenças desmielinizantes (GILROY et al, 2004), e ainda parecem aumentar a susceptibilidade de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* ou para a sua reativação do estado latente bem como o aparecimento de doenças oportunistas (CRAVO et al., 2006). Além de todos esses fatores, existe uma baixa aderência ao tratamento devido a pouca aceitação dos medicamentos, quanto às características físicas (cosméticas) e a necessidade de uso contínuo dos mesmos (MENDONÇA e BURDEN, 2003).

A pouca compreensão da patofisiologia do prurido levou ao avanço no seu tratamento. No momento, sem dúvida esse progresso está relacionado com a descoberta de anti-prurídicos seletivos de uso tópico. Corticóides tópicos não agem diretamente como anti-prurídico, além disso, não devem ser usados para esta finalidade, embora aliviem o prurido secundário às doenças cutâneas. As estratégias para a descoberta de novos anti-prurídicos estão focalizadas em fármacos de uso tópico semelhantes à capsaicina, doxepina e aspirina. A capsaicina tem propriedade anti-prurídico por dessensibilizar terminações nervosas, mas tem suas limitações por irritar o local de aplicação. Já a doxepina é um potente antihistamínico capaz de reverter o prurido. No entanto causa sedação quando absorvida pela pele. O ácido acetilsalicílico de uso tópico tem

mostrado grandes efeitos para reduzir o prurido induzido em modelos experimentais (YOSIPOVITH et al. 1997).

Os antihistamínicos participam diretamente do prurido induzido pelos mastócitos suprimindo os efeitos da histamina como, por exemplo, a vasodilatação, edema e prurido. Antagonista H<sub>1</sub>, azelatina e oxatomida bem como antagonistas não seletivos de H<sub>1</sub>, terfenadina, epinastina e astemizole exercem efeitos antialérgicos e inibem potencialmente os efeitos exercidos pelo composto 48/80 (SHIMMEI et al., 2004). No entanto, antagonistas H<sub>1</sub> geralmente não apresentam efeitos inibitórios suficientes sobre o prurido em pacientes com dermatite atópica, por isso a histamina não é considerada o principal agente pruritogênico na dermatite atópica (BERTH-JONES e GRAHAM-BROWN, 1989; WAHLGREN et al., 1990; HÄNGERMARK e WAHLGREN, 1996; KLEIN e CLARK, 1999; MUNDAY et al., 2002). Por outro lado, corticóides e imunossupressores possuem efeitos terapêuticos significativos sobre a dermatite atópica (NAKAGAWA et al., 1994; HANIFIN e TOFTE, 1999; HIROI, 2001).

Para o favorecimento de novos tratamentos, deve-se levar em consideração a questão multidimensional e a natureza do prurido. O uso de plantas medicinais, como alternativa de tratamento, tem contribuído para amenizar os sintomas desagradáveis do prurido causado por inúmeras doenças de pele.

## 1.5 PLANTAS COMO MEDICAMENTO

A utilização de plantas como alimento e medicamento remonta ao início da vida do homem na Terra, mas foi modificada com o decorrer do tempo, nas diversas culturas e associada a outras práticas por influências ocorridas em cada momento histórico. Em muitos casos, vegetais que eram utilizados preferencialmente como alimento em alguns países, transformaram-se em aliados no arsenal terapêutico em outras regiões. Como tratamento, era utilizado de forma primitiva pela experimentação, pela tentativa e principalmente pela observação, o que acabou produzindo um grande conhecimento popular. Desta forma, fitoterapia é a forma de tratamento e prevenção de doenças que utiliza plantas. Estas plantas sintetizam, através de seu metabolismo primário, diversos

nutrientes e metabólitos ativos e, através do metabolismo secundário, substâncias com ação farmacológica denominadas de princípios ativos. As plantas medicinais na medicina popular, por suas propriedades terapêuticas, adquiriram fundamental importância. No Brasil, principalmente pela extensa e diversificada flora, riquíssima em exemplares, o uso de plantas medicinais sempre foi significativo, fazendo parte da cultura popular (VERDI et al., 2005)

A importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de fármacos é incontestável. A descoberta da atividade biológica destas substâncias não representou apenas o surgimento de grupos novos de medicamentos, mas possibilitou a identificação de novas intervenções terapêuticas. Não se conheciam anestésicos locais, bloqueadores musculares, anticolinérgicos, entre outras categorias terapêuticas, antes do isolamento e estudo da atividade da cocaína, da tubocurarina e da atropina, respectivamente (BRUNETON, 1993; CALIXTO et al., 2001).

Os produtos naturais, com o passar dos anos, contribuíram muito para o desenvolvimento de novos fármacos para fins terapêuticos. Muitos metabólitos secundários derivados de plantas são conhecidos por atuarem direta ou indiretamente em moléculas ou interferem no mecanismo de ação de: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios), produção e ação de segundos mensageiros (cGMP, cAMP, proteínas quinases, cálcio), expressão dos fatores de transcrição (AP-1, NF- $\kappa$ B, proto-oncogenese – c-jun, c-fos e c-myc), expressão de moléculas pró-inflamatórias (iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , neuropeptídeos e proteases) (CALIXTO, et al., 2003).

Recentes contribuições das substâncias naturais envolvem plantas com ação sobre a via do ácido araquidônico, óxido nítrico e fator de transcrição NF- $\kappa$ B para o desenvolvimento de novos fármacos com ação antiinflamatória, tanto em processos agudos quanto em processos crônicos.

#### 1.5.1. Família: *Asteraceae*

É grande a variedade de metabólitos secundários produzidos pelos membros da família *Asteraceae*, que se relacionam com a quantidade de plantas medicinais presente nessa família, incluído a *Baccharis illinita*.

A família *Asteraceae* possui uma sinonímia descrita na literatura: Compositae. Engloba cerca de 1500 gêneros dos quais, aproximadamente 180 encontram-se no Brasil (CRONQUIST, 1981; JUDD et al., 1999). O elevado número de espécies reflete-se também na distribuição geográfica das mesmas, pois aparecem em todos os continentes. No entanto, são mais facilmente encontradas em regiões de clima temperado, subtropical não densamente florestado e tropical montanhoso, dentre estes, especialmente regiões áridas e de campo aberto (CRONQUIST, 1981; JUDD et al., 1999).

As plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros. Inúmeros trabalhos científicos realizados com espécies da família *Asteraceae* possibilitaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque aos flavonóides, alocados como importantes marcadores quimiotaxonômicos, além de sua reconhecida importância para a medicina, no tratamento e prevenção de várias doenças (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

O estudo de espécies do gênero *Baccharis* tem mostrado grandes avanços devido ao seu reputado uso na medicina caseira na América Latina. Sua fitoquímica destaca a ocorrência de flavonóides, diterpenos e triterpenos, sendo nitidamente observado maior acúmulo de flavonas, flavonóis e de diterpenos labdanos e clerodanos (EMERENCIANO et al., 2001).

As espécies do gênero *Baccharis* são no geral arbustos como a carqueja, a vassoura ou vassourinha e medem em média de 0,5 a 4,0 m de altura. Apresentam elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, entre outras regiões do país, onde um grande número delas é utilizado na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças. São consumidas principalmente na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata, sendo também descritas como “remédio para o processo de desintoxicação do organismo” (FRANCO, 1995). Por exemplo, no Brasil e Argentina, *B. crispa* e a *B. notoserigila* são usadas para curar feridas e inflamações. Outras espécies bastante reconhecidas na medicina alternativa são as *B. trimera* e *B. articulata*. A *B. genistelloides* é uma erva medicinal muito usada

no Brasil para uma variedade de doenças, tais como patologias digestivas e do fígado, malária, úlceras, diabetes, anemia, diarreia, inflamações urinárias, amigdalite, verminoses, mal de Hansen, entre outras (MELO, 2001).

Na literatura encontram-se poucos dados sobre a espécie *Baccharis illinita*. A *Baccharis illinita* DC é um arbusto que possui flores amareladas e que se desenvolvem e crescem naturalmente na mata, conhecida popularmente como “chá ventura” ou “erva milagrosa”. (VERDI et al., 2003). É encontrada na região subtropical do Brasil e amplamente usada na medicina como antiinflamatório, anti-infeccioso e com ação gastroprotetora. A formulação mais freqüentemente usada é o chá obtido das folhas e da casca da planta. Além disso, o pó obtido da maceração das folhas é amplamente usado na cicatrização de feridas em pele (BAGGIO et al., 2003).



Figura 8: Exemplos da *Baccharis illinita*

Fonte: Cortesia Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Consuelo A. Marques

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antiinflamatório tópico do extrato bruto da *Baccharis illinita*, bem como de compostos isolados em modelos de inflamação cutânea, e investigar, por de técnicas “in vivo”, alguns dos mecanismos que estão relacionados com a ação antiinflamatória desses compostos.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito antiinflamatório e a migração celular em tecido cutâneo do extrato bruto e compostos isolados da *Baccharis illinita* no modelo de edema de orelha mediado pelo 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) em camundongos;
2. Avaliar o efeito antiinflamatório do extrato bruto de *Baccharis illinita* no modelo de edema de orelha mediado pelo ácido araquidônico em camundongos;
3. Avaliar o efeito antiinflamatório do extrato bruto de *Baccharis illinita* no modelo de edema de orelha mediado pela capsaicina em camundongos;
4. Avaliar o efeito antiinflamatório e a migração celular em tecido cutâneo do extrato bruto de *Baccharis illinita* no modelo de edema de orelha mediado pela oxazolona em camundongos;
5. Avaliar o efeito anti-prurídico do extrato bruto de *Baccharis illinita* no modelo de prurido induzido pelo composto 48/80.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO

As folhas da *Baccharis illinita* foram coletadas na região do município de Vacaria - RS em julho/agosto de 2005. O material foi identificado pelo Prof. Msc. Olavo Guimarães, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Exemplares da mesma espécie estão depositados no herbário do Departamento de Botânica da UFPR, sob o número UPCB 17944.

### 3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *B. illinita* DC

O extrato bruto de *Baccharis illinita* DC, bem como as frações e compostos isolados, foram fornecidos pelo Departamento de Farmacologia da UFPR e também pelo Departamento de Química da UFSC, sob responsabilidade do Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolati.

#### 3.2.1 Extrato bruto hidroalcoólico

As folhas secas (7628 g) foram trituradas e maceradas com álcool etílico técnico (96%) à temperatura ambiente por 24 horas. O solvente foi filtrado e evaporado sob pressão reduzida. O material vegetal foi re-extraído por mais 24 horas, utilizando o solvente recuperado da primeira extração. Após, o material vegetal foi deixado em maceração por mais sete dias. Os extratos dessas extrações foram combinados rendendo 590g do extrato bruto hidroalcoólico. Uma parte do extrato bruto (354g) foi dissolvida em 200mL de uma solução aquosa com 20% de álcool etílico (EtOH) e submetida a partição líquido-líquido, utilizando primeiro hexano e depois acetato de etila (AcOEt). Deste procedimento resultou a fração solúvel em hexano (26,9g), a fração solúvel em AcOEt (240,9g), restando ainda uma fração aquosa (106, 5g). Uma porção da fração solúvel em hexano (22,5g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna utilizando sílica gel (70-230 mesh; *i.d* 5 x 14cm) como fase estacionária, e um sistema de eluição do tipo gradiente de polaridade com misturas de hexano – AcOEt (aumentando a porcentagem de AcOEt: 3, 5, 10, 15 ..... 100%) e AcOEt – EtOH

(aumentando a porcentagem de EtOH: 20, 50, 70 e 100%). Noventa e oito frações de 100mL cada foram coletadas, concentradas e reunidas conforme o perfil das cromatografias em camada fina (TLC). As frações combinadas 25-27 (eluidas com o sistema de solvente: hexano-AcOEt 85 : 15 v:v), 31-35 (eluidas com o sistema de solvente: hexano-AcOEt 75 : 25 v:v), 36-56 (eluidas com o sistema de solvente: hexano-AcOEt 85 : 15 v:v), 75:25 até 60:40 v:v) foram purificadas em acetona resultando nos compostos baurenol (81,6 mg),  $\alpha$ -spinasterol (95,5 mg) e ácido oleanólico (156,8mg) respectivamente (FIGURA 9). Estes compostos foram caracterizados através de espectroscopia na região do infravermelho, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e depois, comparando com dados da literatura e confirmados através da co-eluição destes compostos, com padrões, por cromatografia gasosa. A fração 30 (29,0mg, eluida com o sistema de solvente: hexano-AcOEt 80 : 10 v:v) foi purificada em acetona e os dados obtidos pelas técnicas espectroscópicas, nos permitiu propor que o composto é um alquil éster derivado do ácido p-cumárico.

### 3.2.2 Extrato em acetona

As folhas secas e inteiras (1048,7g) foram percoladas em acetona por uma hora. O extrato em acetona foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida rendendo 134,5g de massa seca. Após a extração com acetona, as folhas foram maceradas com álcool etílico por sete dias resultando em 82,2g do extrato etanólico.

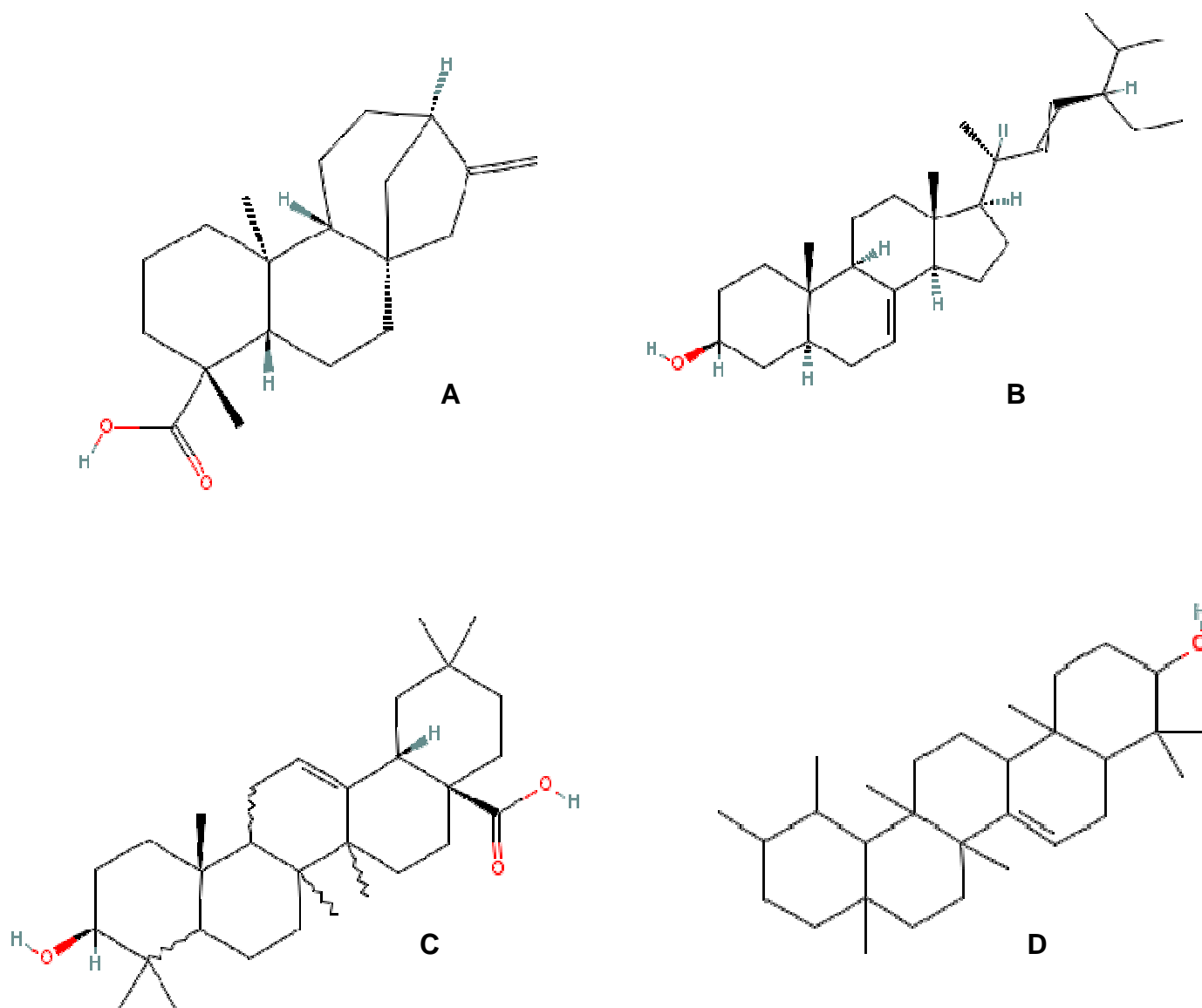


Figura 9: Compostos isolados da fração acetato da *Baccharis illinita*. **(A)** Ácido kaurenóico; **(B)**  $\alpha$  - *spinasterol*; **(C)** ácido oleanóico; **(D)** Baurenol

Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2002); Connolly e Hill (2002); Reginatto et al. (2001)

### 3.3 DROGAS, DOSES E SOLUÇÕES

#### 3.3.1 Drogas e doses

- Dexametasona: (Sigma, Chemicals & Co, EUA) – Glicocorticóide (0,10mg/20 $\mu$ L – via tópico: orelha)
- Extrato bruto de *B. illinita* (0,03; 0,1; 0,3; 1 mg/20 $\mu$ L – via tópico: orelha) e (300; 600; 1000mg/kg – via oral)
- Acido kaurenóico: Composto isolado, (0,1; 1; 3  $\mu$ mol/20 $\mu$ L – via tópico: orelha)
- Acido oleanóico: Composto isolado, (0,1; 1; 3  $\mu$ mol/20 $\mu$ L – via tópico: orelha)
- $\alpha$ -spinasterol: Composto isolado, (0,1; 1; 3  $\mu$ mol/20 $\mu$ L – via tópico: orelha)
- Baurenol: Composto isolado, (0,1; 1; 3  $\mu$ mol/20 $\mu$ L – via tópico: orelha)
- 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) (Sigma, Chemicals & Co, EUA): 2,5 $\mu$ g/20 $\mu$ L – via tópico: orelha
- Composto 48/80: (Sigma, Chemicals & Co, EUA) – Agente prurítogênico (100 $\mu$ g/100 $\mu$ L - via subcutânea)
- Ácido araquidônico: (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 2mg/20 $\mu$ L – via tópico: orelha
- Capsaicina (Purifarma): 200 $\mu$ g/20 $\mu$ L – via tópico: orelha
- Indometacina (Sigma, Chemicals & Co, EUA): 2mg/20 $\mu$ L – via tópico: orelha
- Oxazolona: (Sigma, Chemicals & Co, EUA) solução a 2% - (via tópica: 50 $\mu$ L na região abdominal e 20 $\mu$ L na orelha).

O extrato bruto de *B. illinita*, bem como seus compostos isolados, quando administrados topicamente, foram diluídos em 4% de dimetilsulfóxido (DMSO), 20% de etanol e 76% de acetona. As frações, o TPA, o ácido araquidônico, a capsaicina, a dexametasona, a indometacina e a oxazolona, quando aplicadas por via tópica, foram diluídas apenas em acetona. O composto 48/80 foi diluído em salina e o extrato bruto de *B. illinita*, quando administrado por via oral, foi

diluído em salina e tween 80. A concentração final do tween 80 não excedeu a 5%, de modo a não influenciar no efeito causado pelo extrato.

### 3.3.2. Soluções

#### **Solução HTAB**

HTAB.....5g  
Água destilada.....1L

#### **Solução TMB 18,4 mM**

TMB..... 6,6mg  
DMF.....1,5mL

#### **Solução A**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....14,352g  
Água destilada.....1L

#### **Solução B**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....2,8597g  
Água destilada.....100mL

#### **Solução fosfato de sódio 80 mM – pH: 5,4**

Solução A.....588mL  
Solução B.....12mL

#### **Solução fosfato de sódio 0,22 mM – pH: 5,4**

Solução A.....269,5mL  
Solução B.....5,5mL

#### **Solução fosfato de sódio com 0,5% de HTAB**

Tampão fosfato 80 mM.....300mL  
HTAB.....1,5g

**Peróxido de hidrogênio 0,017%**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	0,5mL
Água destilada.....	1,5mL
Retirar 12µL desta solução e acrescentar:	
Água destilada.....	5mL

**Acetato de sódio 1,46M – pH:3,0**

NaOAc.....	5,97g
Água destilada.....	50mL

Os materiais utilizados nos experimentos foram autoclavados à 120° C durante 30 minutos ou adquiridos estéreis e as soluções preparadas em condições assépticas.

**3.4 ANIMAIS**

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos *SW/SS* machos, pesando entre 25 – 35g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}$  C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à ração e água antes de cada experimento. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de experimentação no mínimo dois dias antes dos experimentos.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná sob o protocolo número 127 e estão de acordo com as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório (ZIMMERNANN, 1983).

**3.5 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA**

O edema foi avaliado de acordo com a metodologia revisada por Hecker e Schmidt (1974). Para tanto, os animais, anteriormente as medidas, foram anestesiados em éter. A espessura da orelha foi avaliada antes e após a indução

do processo inflamatório utilizando um micrômetro digital (Mitutoyo Serie 293). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e a sua espessura foi registrada em  $\mu\text{m}$  e os dados expressos como aumento da espessura da orelha. Para minimizar variações devido à técnica, os experimentos foram realizados, sempre por um único experimentador. O extrato, as frações, os compostos isolados e agentes flogísticos foram dissolvidos em seus respectivos veículos e aplicados topicamente na orelha direita de camundongos.

### 3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.6.1 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato)

O TPA é um constituinte ativo do óleo de cróton que induz inflamação tópica e resposta hiperproliferativa em animais de modo semelhante a muitas doenças de pele, como na psoríase, por exemplo. O edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA ( $2,5 \mu\text{g}/20\mu\text{L}$ ) na orelha direita de camundongos. O extrato bruto, as frações e os compostos isolados da *B. illinita* foram aplicados topicamente logo após o tratamento com TPA. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 6 h após a aplicação do agente flogístico (DE YOUNG, et al., 1989). Biópsias (círculos de 6mm de tecido da orelha dos camundongos) das orelhas dos camundongos foram coletadas 24h após a aplicação do TPA e submetidas à avaliação histológica e da atividade das enzima mieloperoxidase.

#### 3.6.2 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina

A capsaicina é a substância ativa da pimenta responsável por efeitos irritantes e pungentes na pele, induzindo resposta inflamatória neurogênica assim como vasodilatação reflexa, extravasamento de plasma e sensibilização nociceptiva (HOLZER, 1991). A capsaicina interage com receptores vanilóides (TRPV1) e produz a degranulação de mastócito no tecido conectivo da pele, com conseqüente produção de vasodilatação e eritema seguido do desenvolvimento

de edema em poucos minutos. Drogas como corticosteróides, antagonistas H<sub>1</sub> e bloqueadores de canais de cálcio são capazes de inibir o edema provocado pela capsaicina.

A capsaicina foi dissolvida em acetona na concentração de 200µg/20µL e aplicado topicamente nas duas faces da orelha dos camundongos 15 minutos após a aplicação tópica do extrato bruto da *B. illinita* (1mg/20µL). O valor do edema foi avaliado 30 minutos após a aplicação do agente flogístico (GABOR; RAZGA, 1992).

### 3.6.3 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica do ácido araquidônico

Os metabólitos derivados do ácido araquidônico (AA) participam do processo inflamatório e estão envolvidos em inúmeras patologias cutâneas como dermatite atópica e psoríase. Humes et al. (1986) demonstrou que o ácido araquidônico aplicado topicamente tem como principal metabólito a prostaglandina E<sub>2</sub> e Leucotrieno C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub>. Esses mediadores estão envolvidos com o desenvolvimento do edema bem como extravasamento plasmático, mudanças no fluxo sanguíneo e eritema. Esses sinais atingem o pico em 30 minutos e persistem até três horas quando o AA é aplicado numa concentração de 500µg/sítio (GABOR, 2000). Essa resposta é bloqueada por inibidores da lipooxigenase e ciclooxigenase.

O AA foi diluído em acetona na concentração de 2mg/20µL e administrado topicamente nas duas faces da orelha do camundongo. Logo em seguida foi aplicado, no mesmo local, o extrato bruto de *B. illinita* (1mg/20µL). O edema foi avaliado uma hora após o desafio com o agente flogístico (YOUNG et al., 1984; CRUMMEY et al., 1987).

### 3.6.4 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de oxazolona

Este modelo mimetiza a hipersensibilidade tardia do tipo IV, o qual envolve a participação dos linfócitos T e macrófagos. Esta reação se desenvolve de 24 a 72 horas após o contato com a oxazolona. A oxazolona, introduzida pela segunda

vez no camundongo, é captada pelas células apresentadoras de antígenos, processada e expressada na superfície celular em conjunto com moléculas de MHC de classe II. Este antígeno é então reconhecido por linfócitos T<sub>h</sub>1, que uma vez ativados, liberam citocinas inflamatórias que agem sobre células endoteliais promovendo: aumento de fluxo sanguíneo na região; expressão de moléculas de superfície que favorecem a adesão leucocitária à parede vascular; produção e secreção de substâncias quimiotáticas e alteração morfológica das células endoteliais, favorecendo o extravasamento plasmático. Todos esses eventos induzem uma resposta inflamatória características de doenças cutâneas semelhantes à dermatite de contato. Para tanto, os camundongos foram submetidos à tricotomia abdominal dois dias antes do experimento. A sensibilização dos animais foi realizada com a aplicação tópica de 50 µL de solução de oxazolona a 2% (p/v) em acetona na parte ventral (abdome) dos animais em dois dias consecutivos (fase de sensibilização). Logo após cada aplicação de oxazolona, foi também aplicado, no mesmo local (região ventral), o tratamento com o extrato de *B. illinita* na dose de 2mg/50µL ou o veículo no mesmo volume. Após 6 dias, o desafio foi realizado. Para tal, 30 µL de uma solução de oxazolona a 2% foram administrados topicamente nas orelhas dos camundongos (fase de indução). Logo após a administração de oxazolona o extrato bruto da *B. illinita* na dose de 1mg/sítio foram administrados por via tópica duas vezes ao dia (intervalo de 12 horas) e o edema avaliado em 24; 48; 72 e 96h após o desafio (RECIO et al., 2000). Após a avaliação do edema, biópsias (círculos de seis milímetros de tecido da orelha dos camundongos) das orelhas dos camundongos foram coletadas e submetidas à avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase, indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares.

### 3.7 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE

A atividade da enzima mieloperoxidase, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando metodologia de Bradley et al. (1982) modificada por De Young et al. (1989). As biópsias (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram adicionados a 0,75 mL de

solução fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionados 0,75 mL do solução anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de solução fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, 85 µL, PBS 0,22 M pH 5,4 e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM, dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi incubada a 37°C por 3 min e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) na absorvância de 620 nm e expressa como mDO/biópsia.

### **3. 8 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Amostras de orelhas coletadas de camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA e oxazolona foram fixadas em líquido de Bouin (solução contendo: 78,9% de solução saturada de ácido pícrico; 26,3% de formol e 5,3% de ácido acético). As orelhas foram desidratadas em álcool, blocadas em parafina, seccionadas em cortes de 3-4 µm através de um micrótomo, e corados com hematoxilina e eosina (RECIO et al., 2000). Para avaliação da espessura da epiderme foi utilizada lente ocular graduada. A infiltração celular (leucócitos) foi avaliada em áreas representativas em aumento de 200 e/ou 400x.

### **3.9 INDUÇÃO DE PRURIDO EM CAMUNDONGOS**

O prurido é um sintoma especial da pele que ocorre em uma infinidade de patologias cutâneas como eczema atópico, urticária e pele seca. O composto 48/80 é um produto de condensação sintético de N-metil-p metoxifenetilamina com formaldeído, cuja ação é a degranulação dos mastócitos e liberação de

histamina, envolvida com o sintoma de prurido (BENYON et al., 1989 e OHMURA et al., 2004). Os animais foram aclimatizados no local dos experimentos durante 10 minutos antes do tratamento. Os animais receberam a aplicação, por via subcutânea em região dorsal, do agente indutor do prurido (composto 48/80 - 100µg/100µL), uma hora (1h) após a administração via oral do extrato bruto de *B. illinita* na dose de (300, 600 e 1000mg/kg). Logo após foram colocados em funis de vidro para a contagem do número de coceira por 30 minutos. O comportamento de coçar foi considerado quando os animais levantaram as patas traseiras em direção a região dorsal, local onde foi aplicado o composto 48/80.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

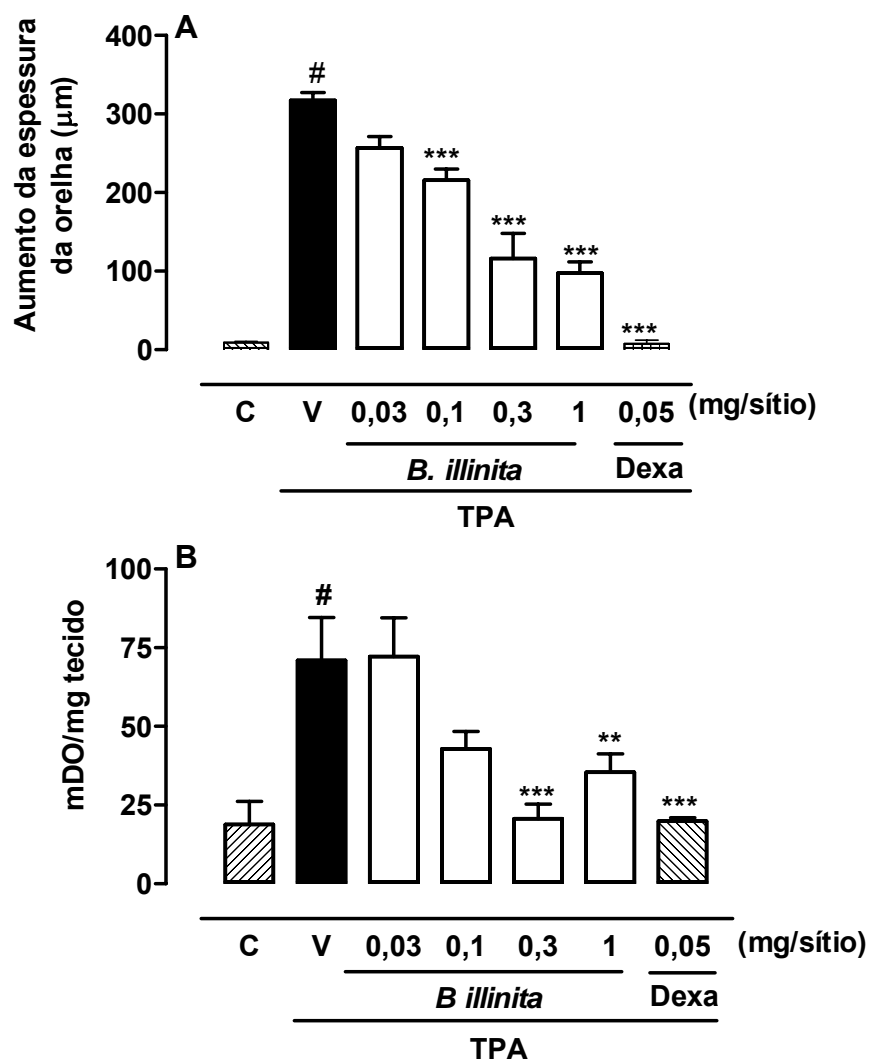
Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.Média) Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman Keuls quando necessário. Valores de P menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância. Todos os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism version 3.00 for Windows*, San Diego Califórnia, EUA.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *B. illinita* SOBRE O EDEMA DE ORELHA E MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDO POR TPA

A aplicação dos veículos (acetona + DMSO + etanol) na orelha direita, não induziu aumento da espessura da orelha (FIGURA 10A). Para maior clareza este grupo controle não será apresentado nas figuras posteriores. Na sexta hora após a aplicação do TPA, os animais exibiram um aumento significativo na espessura da orelha o qual foi inibido, de maneira dependente da dose (0,03; 0,1; 0,3; e 1mg/sítio), pela aplicação tópica do extrato bruto de *B. illinita* bem como pela dexametasona (FIGURA 10A). A inibição máxima e a  $DI_{50}$  da média do edema calculada para o extrato bruto foi de  $73 \pm 5\%$  e 0,19 (0,15 – 0,23), respectivamente, enquanto que a inibição máxima obtida pela dexametasona foi de  $95 \pm 2\%$ .

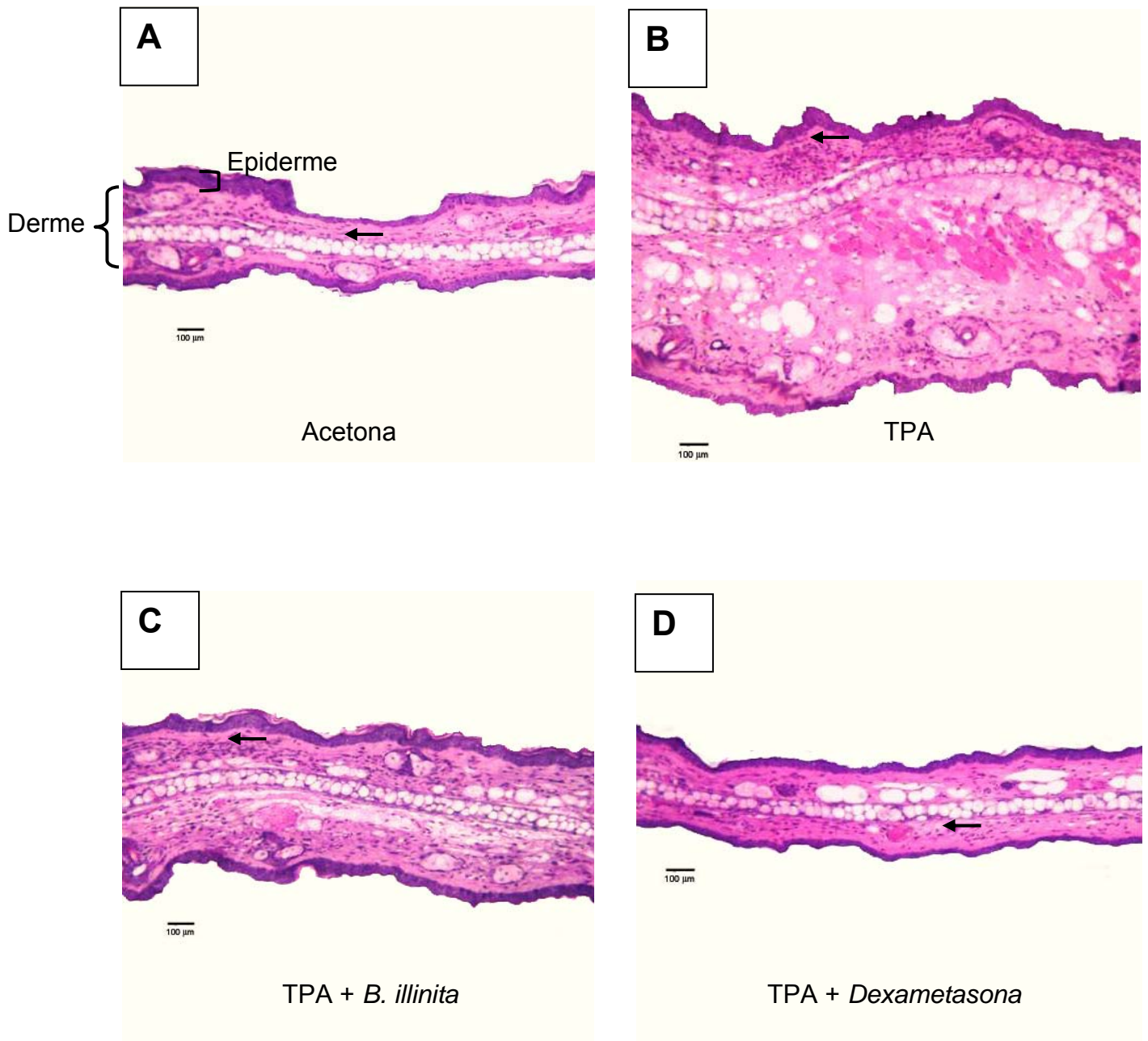
A administração de TPA aumentou significativamente a atividade da enzima mieloperoxidase (indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares) (FIGURA 10B). Esta atividade foi significativamente reduzida nos animais que receberam o tratamento com o extrato somente nas doses de 0,1; 0,3 e 1mg/sítio bem como nos animais que receberam dexametasona (FIGURA 10B). A inibição máxima e a  $DI_{50}$  para a atividade da mieloperoxidase nos animais tratados com o extrato bruto foi respectivamente  $71 \pm 5\%$  e 0,21 (0,18 – 0,25) e a inibição máxima para a atividade da mieloperoxidase em animais tratados com a dexametasona foi de  $72 \pm 2\%$ .



**FIGURA 10: Efeito do extrato bruto de *B. illinita* sobre o edema de orelha e migração celular induzido pelo TPA:** Os animais foram desafiados com o TPA (V) e logo em seguida tratados com o extrato bruto de *B. illinita* nas doses indicadas na figura ou dexametasona (Dexa). Nos animais controle (C) foi aplicado somente a acetona. A espessura da orelha foi avaliada 6h após a aplicação do TPA (Painel A). Vinte e quatro horas depois do desafio, as orelhas foram coletadas para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (Painel B). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) (Painel A) ou atividade da enzima mieloperoxidase (mDO/biópsia) (Painel B) ( $n=8-12$ ). \* Diferença significativa em relação ao grupo veículo (V),  $p<0,05$ . \*\* Diferença significativa em relação ao grupo veículo (V),  $p<0,01$ . \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo veículo (V),  $p<0,001$ . # Diferença significativa em relação ao grupo controle (C),  $p<0,001$ .

#### **4.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA RELATIVA À ADMINISTRAÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE *B. illinita* DC**

A FIGURA 11 mostra cortes histológicos das orelhas dos camundongos 24h após a aplicação tópica de TPA. Os animais que receberam o agente flogístico demonstraram intensa infiltração celular (polimorfonucleares) na derme além de edema e hiperplasia epidérmica (FIGURA 11B) quando comparado a animais que receberam somente o veículo (FIGURA 11A). Estes eventos foram reduzidos pela aplicação tópica do extrato bruto de *B. illinita* (1mg/sítio) (FIGURA 11C) bem como dexametasona (0,05 mg/sítio) (FIGURA 11D). O grupo que recebeu o veículo não apresentou aumento da espessura da orelha quando comparado ao animal normal.



**FIGURA 11.** Cortes transversais de orelhas de camundongos. Biópsias coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x) 24 h após a aplicação de TPA. **(A)** animal tratado com veículo (acetona), **(B)** TPA, **(C)** TPA + extrato bruto de *B. illinita* (1 mg/orelha) e **(D)** TPA + dexametasona (0,05 mg/orelha). As setas indicam as células polimorfonucleares na derme.

### 4.3 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA *B. illinita* SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA

Para dar seguimento aos estudos, cada composto isolado da fração acetato de etila foi estudado no modelo de inflamação tópica induzido pelo TPA nas concentrações de 0,1 – 3  $\mu\text{mol/sítio}$ , a fim de verificar qual(is) o(s) composto(s) que possui(em) atividade antiinflamatória.

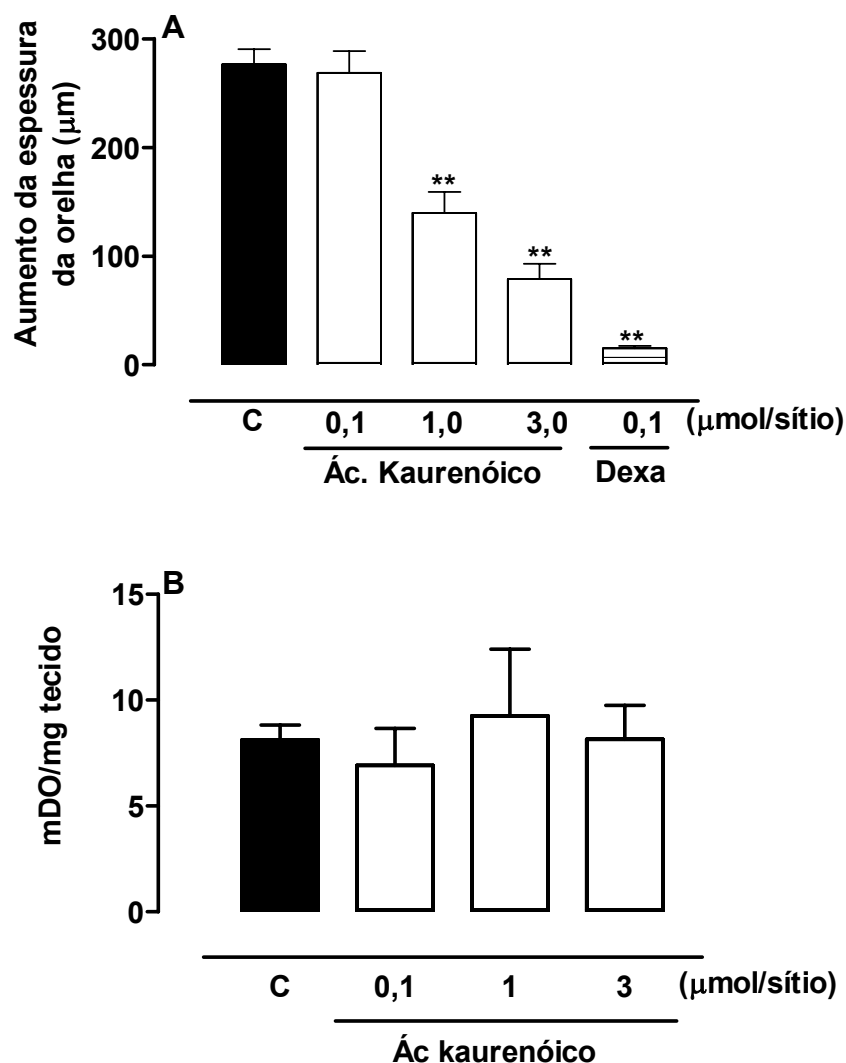
A FIGURA 12A mostra que a administração do ácido Kaurenóico nas doses 1 e 3  $\mu\text{mol/orelha}$  reduziram o edema de orelha induzido pelo TPA. A inibição máxima para o edema foi de  $71 \pm 5\%$  e a  $DI_{50}$  das médias calculadas com intervalo de confiança de 95% foi de 2,01 (1,62 – 2,49). O composto não apresentou efeito sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (FIGURA 12 B).

O tratamento dos animais com o  $\alpha$ - spinasterol nas doses de 1 e 3  $\mu\text{mol/orelha}$  reduziu a espessura da orelha em aproximadamente 27,4 e 65% respectivamente quando comparado ao grupo que recebeu apenas o estímulo irritante (C). A outra dose 0,1  $\mu\text{mol/orelha}$  não apresentou efeito significativo sobre o edema (FIGURA 13A). A  $DI_{50}$  calculada foi 2,16 (1,48 – 3,16). O composto não apresentou efeito sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (FIGURA 13 B).

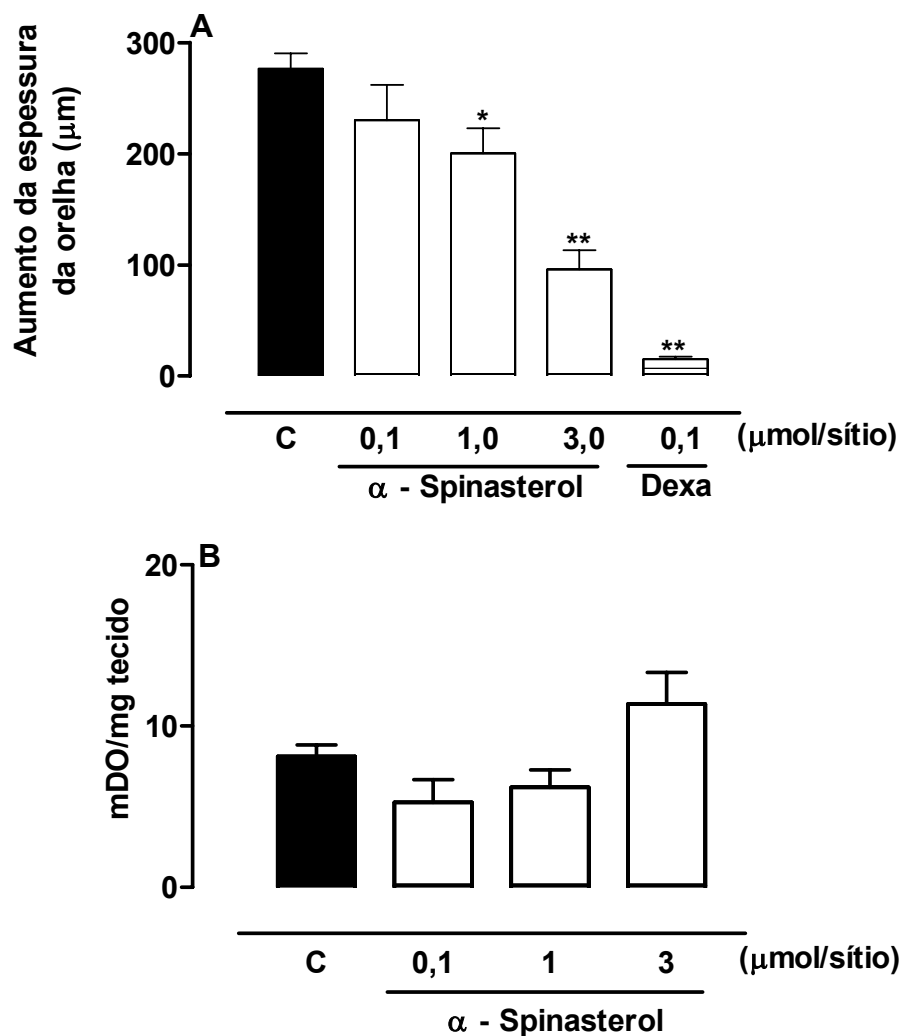
A FIGURA 14 demonstra a ação do ácido oleanólico sobre o edema induzido pelo TPA. O composto nas doses 1 e 3  $\mu\text{mol/orelha}$  reduziu significativamente o edema em 33% e 71% respectivamente. A dose de 0,1  $\mu\text{mol/sítio}$  não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo que recebeu o TPA (FIGURA 14A). A dose de inibição máxima e a  $DI_{50}$  calculada (com intervalo de confiança de 95%) foi de  $71 \pm 2\%$  e 2,08 (1,69 – 2,56). Da mesma forma, a atividade da enzima mieloperoxidase em biópsias das orelhas dos camundongos, foi reduzida nos animais que receberam o tratamento com o ácido oleanólico em todas as doses. A inibição máxima para a atividade da mieloperoxidase foi de  $36 \pm 6\%$  na dose de 1  $\mu\text{mol/orelha}$  (FIGURA 14B).

A FIGURA 15 mostra que a administração do baurenol na dose de 1  $\mu\text{mol/orelha}$  reduziu significativamente o edema induzido pelo TPA. A dose de 0,1  $\mu\text{mol/sítio}$  não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo que recebeu o TPA. A inibição máxima calculada foi de  $30 \pm 6\%$  (FIGURA 15A). O

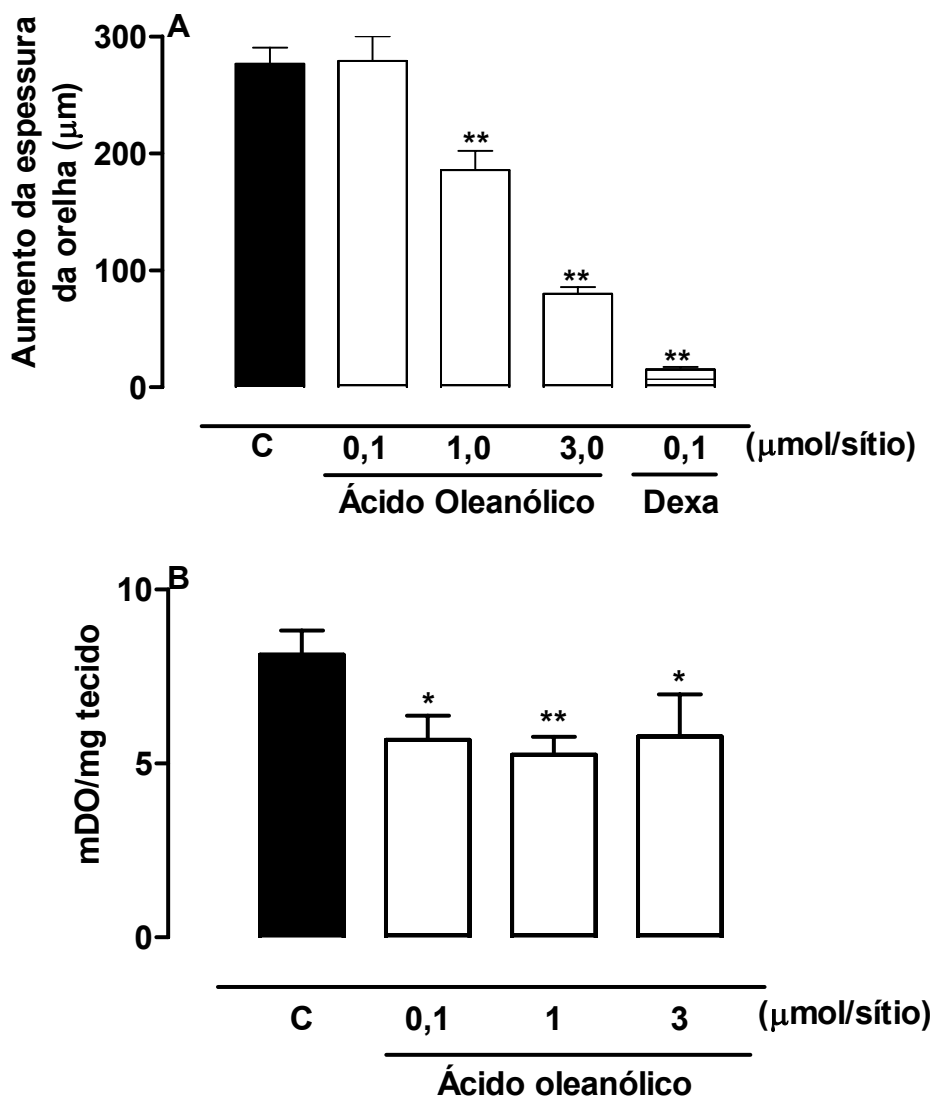
composto não apresentou efeito sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (FIGURA 15B).



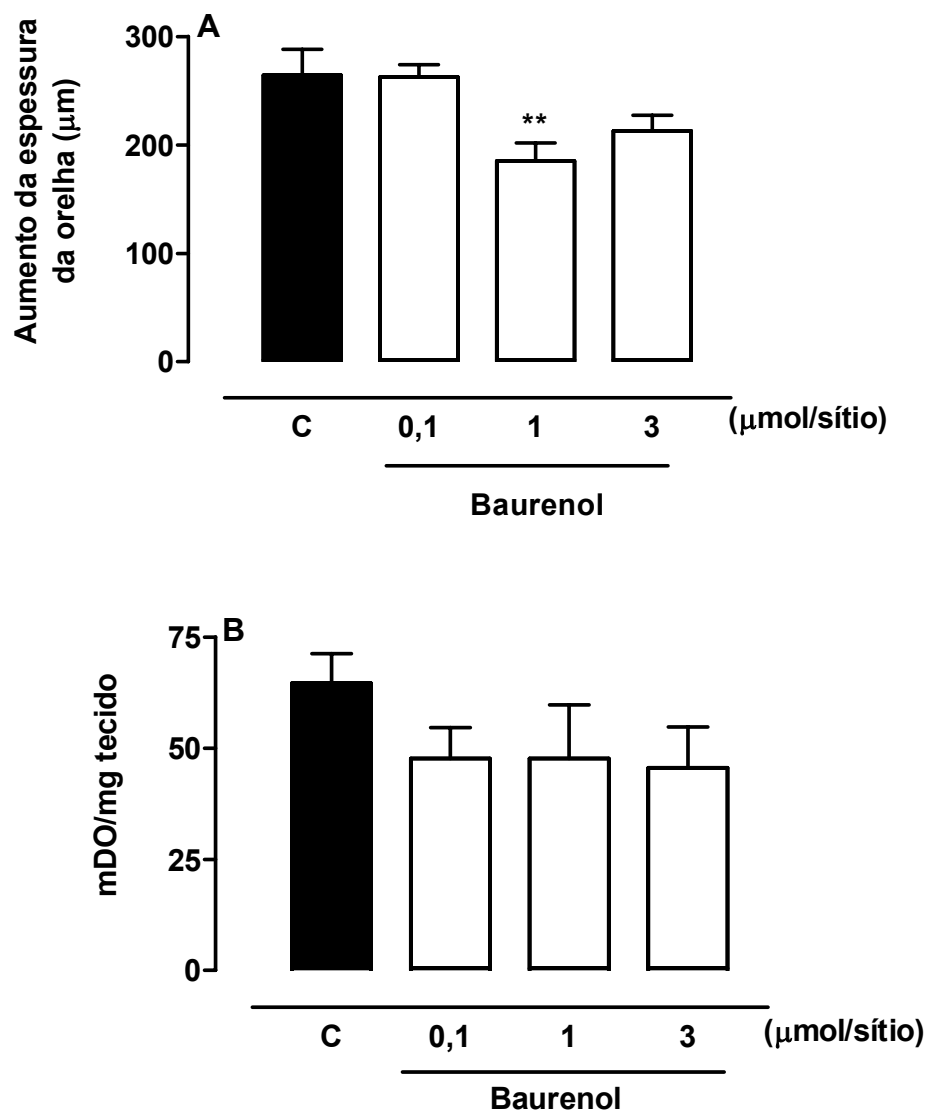
**FIGURA 12. Efeito do ácido Kaurenóico sobre o edema de orelha e migração celular induzido pelo TPA.** Os animais foram desafiados com o TPA (C) e logo em seguida tratados com o ácido Kaurenóico, por via tópica, nas doses 0,1; 1 e  $3\mu\text{mol/sítio}$ . A espessura da orelha foi avaliada 6h após da aplicação do TPA. Vinte e quatro horas depois do desafio, as orelhas foram coletadas para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (Painel B). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) (Painel A) ou a migração leucocitária (mDO/biopsia) (Painel B). (n= 8 – 12). \*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle (TPA),  $p < 0,01$ .



**FIGURA 13. Efeito do  $\alpha$ -spinasterol sobre o edema de orelha e migração celular induzido pelo TPA.** Os animais foram desafiados com o TPA (C) e logo em seguida tratados com o *Spinasterol*, por via tópica, nas doses 0,1; 1 e 3  $\mu\text{mol/sítio}$ . A espessura da orelha foi avaliada 6h após da aplicação do TPA. Vinte e quatro horas depois do desafio, as orelhas foram coletadas para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (Painel B). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) (Painel A) ou a migração leucocitária (mDO/biópsia) (Painel B), (n= 8 – 12). \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (C - TPA)  $p < 0,05$ ; \*\* Diferença significativa em relação ao grupo C,  $p < 0,01$ .



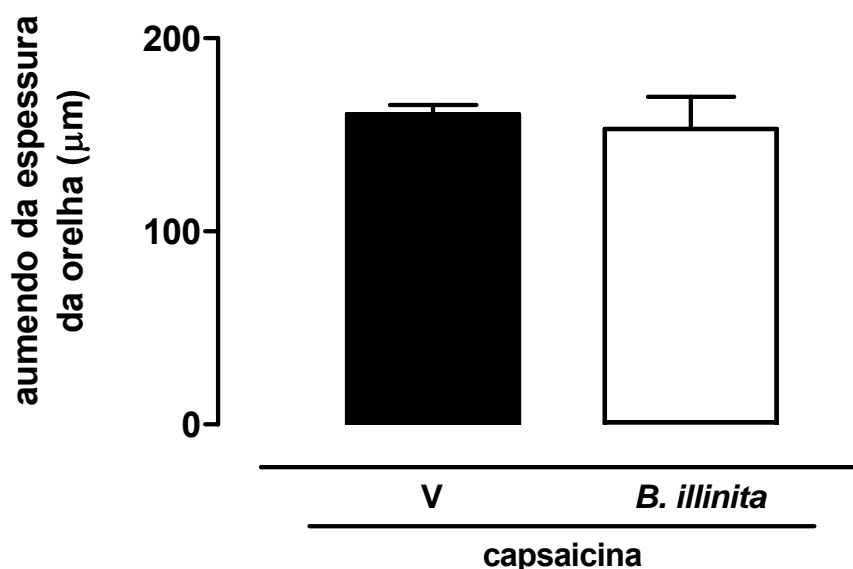
**FIGURA 14: Efeito do ácido oleanólico sobre o edema de orelha e migração celular induzido pelo TPA.** Os animais foram desafiados com o TPA (C) e logo em seguida tratados com o ácido oleanólico por via tópica, nas doses 0,1; 1 e 3  $\mu\text{mol/sítio}$ . A espessura da orelha foi avaliada 6h após da aplicação do TPA. Vinte e quatro horas depois do desafio, as orelhas foram coletadas para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (Painel B). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) (Painel A) ou a migração leucocitária (mDO/biópsia) (Painel B), (n= 8 – 12). \* Diferença significativa em relação ao grupo controle (C - TPA)  $p < 0,05$ ; \*\* Diferença significativa em relação ao grupo C,  $p < 0,01$ .



**FIGURA 15. Efeito do Baurenol sobre o edema de orelha e migração celular induzido pelo TPA.** Os animais foram desafiados com o TPA (C) e logo em seguida tratados com o baurenol por via tópica, nas doses 0,1; 1 e 3  $\mu\text{mol}/\text{sítio}$ . A espessura da orelha foi avaliada 6h após da aplicação do TPA. Vinte e quatro horas depois do desafio, as orelhas foram coletadas para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (Painel B). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) (Painel A) ou a migração leucocitária (mDO/biópsia) (Painel B), (n= 8 – 12). \*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle (TPA),  $p < 0,01$ .

#### 4.4. EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *B. illinita* SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA CAPSAICINA

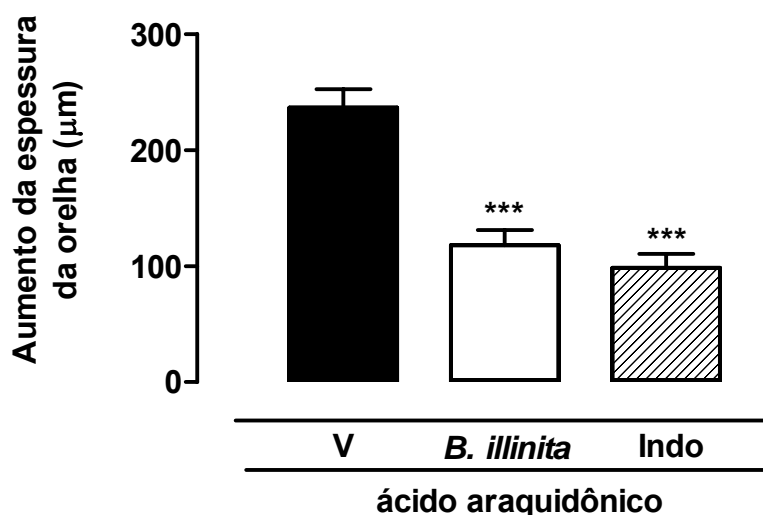
A resposta inflamatória à capsaicina desenvolveu-se rapidamente, 30 minutos após a aplicação do agente. A FIGURA 16 mostra que o extrato bruto de *B. illinita* (1mg/sítio), aplicado 15 minutos antes do desafio com a capsaicina não foi capaz de diminuir o extravasamento plasmático provocado por esse agente indutor.



**FIGURA 16.** Efeito do extrato de *Baccharis illinita* sobre o edema de orelha induzido por capsaicina. Os animais receberam aplicação tópica de capsaicina na dose de 200 µg/20µL. Quinze minutos antes foram administrados, por via tópica, o extrato bruto de *B. illinita* (1mg/sítio) ou o veículo (V). O tratamento com o extrato de *B. illinita* foi administrado por via tópica 15 minutos antes de receber o agente indutor de edema. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do aumento da espessura da orelha (n= 8 – 12).

#### 4.5. EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *B. illinita* SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

O AA na dose de 2mg/20 $\mu$ L foi aplicado na orelha direita de camundongos e 1 hora após os animais apresentaram aumento da espessura da orelha. Como observado na figura 17, o extrato de *B. illinita* preveniu o extravasamento plasmático em  $50 \pm 6\%$ , de forma similar à indometacina (antiinflamatório não esteroïdal) que reduziu o edema em  $58 \pm 5\%$ . (FIGURA 17).

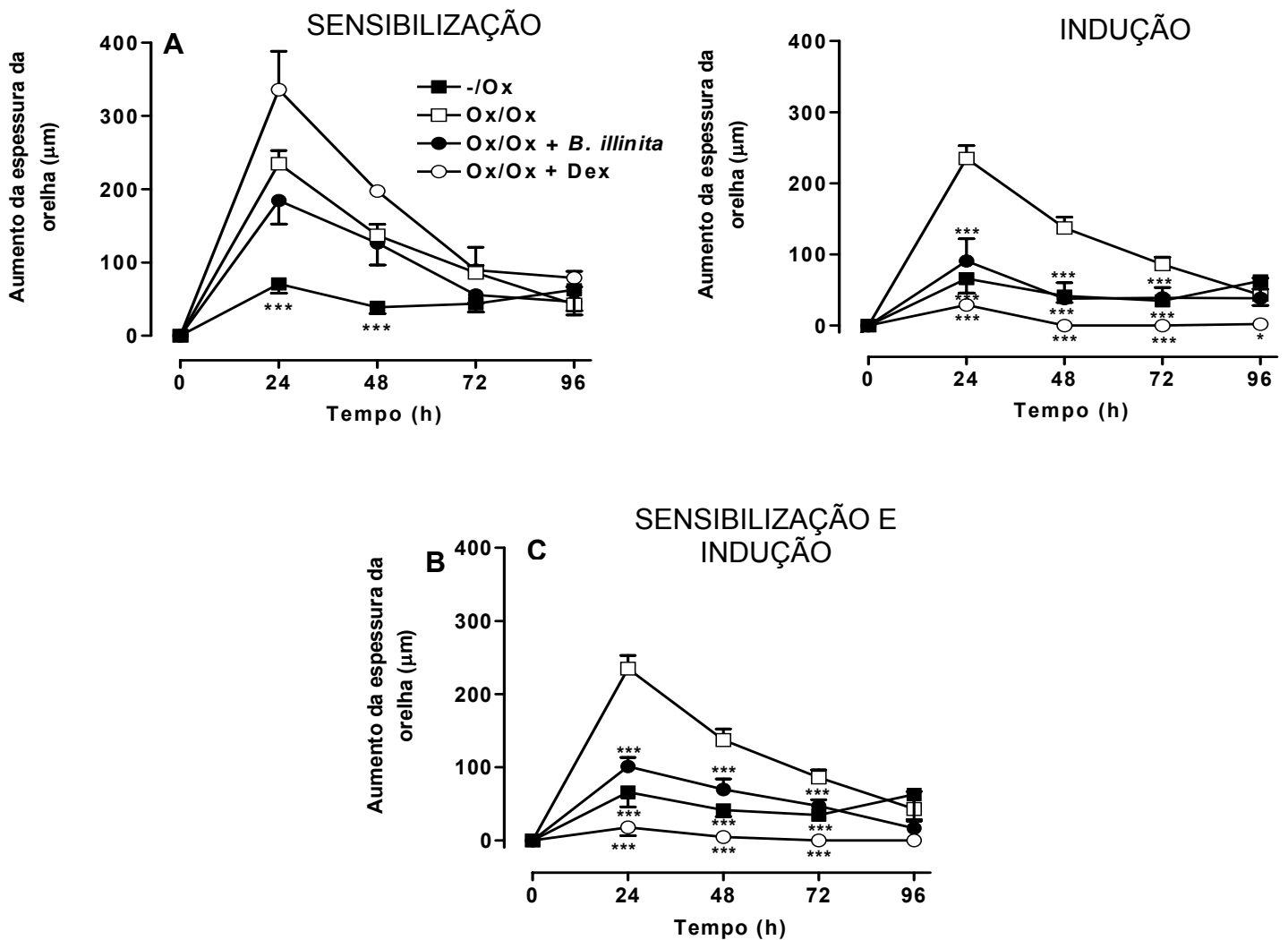


**FIGURA 17.** Efeito do extrato de *Baccharis illinita* sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico. Os animais receberam aplicação tópica de ácido araquidônico na dose de 2mg/20 $\mu$ L e imediatamente após foi administrado, por via tópica, o extrato bruto de *B. illinita* (1mg/sítio), indometacina (Indo - 2mg/sítio) ou o veículo (V). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do aumento da espessura da orelha (n= 8 – 12). \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle (V),  $p < 0,001$ .

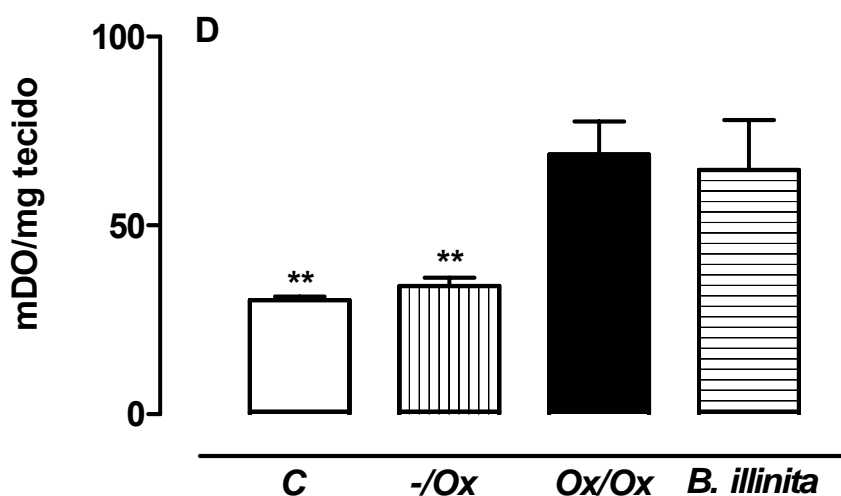
#### 4.6. EDEMA DE ORELHA INDUZIDA PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE OXAZOLONA

A FIGURA 18 demonstra o efeito do extrato bruto da *B. illinita* sobre a reação de hipersensibilidade tardia induzida por oxazolona na orelha direita dos camundongos. O tempo zero (0h) representa o sexto dia após o primeiro contato do animal com o hapteno (oxazolona), bem como o dia da indução com o mesmo hapteno. Os grupos sensibilizados previamente com oxazolona (Ox/Ox) apresentaram um aumento significativo na espessura da orelha quando comparados aos grupos que não receberam sensibilização prévia (-/Ox) (FIGURA 19A-C). O tratamento dos animais com o extrato bruto da *B. illinita* ou dexamentasona (DEX), somente na fase de sensibilização, não modificou significativamente o edema causado pela oxazolona (FIGURA 18A). Por outro lado, o tratamento dos animais com extrato bruto da *B. illinita* ou dexametasona somente na fase de indução, reduziu significativamente o edema quando avaliado em 24, 38 e 72h após a segunda aplicação de oxazolona (FIGURA 18B). Resultados similares foram observados quando os tratamentos foram feitos em ambas as fases (FIGURA 18C).

Biópsias foram coletadas deste último grupo (tratamentos nas fases de sensibilização e indução) 24h após a administração da oxazolona para análise da atividade da mieloperoxidase (FIGURA 19). Os animais que não receberam oxazolona na fase de sensibilização (-/Ox) não apresentaram um aumento significativo da atividade da mieloperoxidase quando comparado ao grupo controle. Por outro lado os animais que receberam oxazolona na fase de sensibilização bem como na fase de indução (Ox/Ox) apresentaram um aumento significativo na atividade da enzima mieloperoxidase. O tratamento com o extrato bruto de *B. illinita* em ambas as fases não modificou essa resposta.



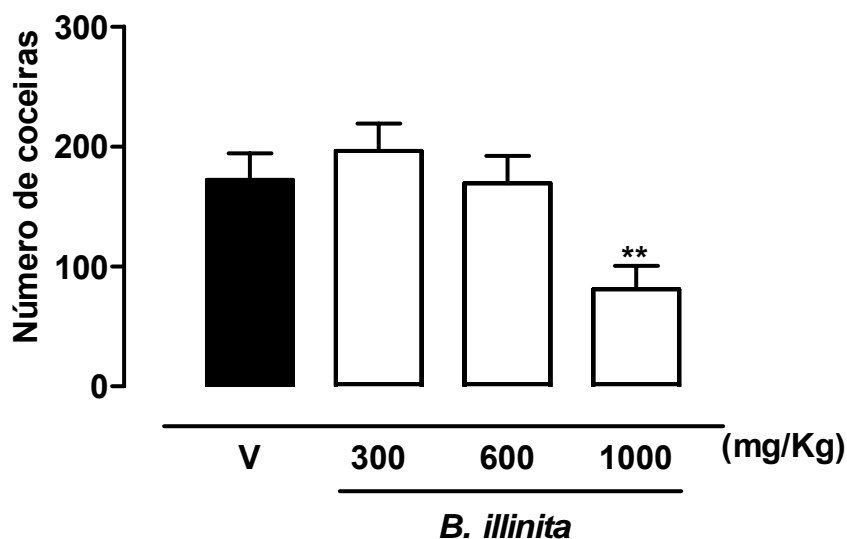
**FIGURA 18. Efeito do extrato de *Baccharis illinita* sobre a hipersensibilidade tardia induzida por oxazolona:** Os animais foram sensibilizados com oxazolona (Ox) e seis dias após, foram re-expostos ao mesmo hapteno. No painel A, os animais foram tratados com o extrato bruto de *B. illinita* (1mg/sítio), dexametasona (Dex -0,05 mg/sítio) somente na fase de sensibilização. Painel B os animais receberam o mesmo tratamento somente na fase de indução. Painel C os animais receberam os mesmos tratamentos em ambas as fases. Animais controle receberam somente Ox em ambas as fases (Ox/Ox) ou não receberam Ox na fase de sensibilização (-/Ox). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do aumento da espessura da orelha em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) N=7-10. \* Diferença significativa em relação ao grupo Ox/Ox,  $p < 0,5$ ; \*\* Diferença significativa em relação ao grupo Ox/Ox,  $p < 0,01$ ; \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo Ox/Ox,  $p < 0,001$ ; # Diferença significativa em relação ao grupo -/Ox,  $p < 0,01$ .



**Figura 19. Efeito da atividade da enzima mieloperoxidase sobre a hipersensibilidade tardia induzida por oxazolona.** Biópsias dos animais tratados em ambas as fases com o extrato bruto de *B. illinita* (1mg/sítio) foram coletados após 24h para avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase. Biópsias controle (C) foram realizadas em animais Naive. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. da migração leucocitária (mDO/biópsia). \*\* Diferença significativa em relação ao grupo Ox/Ox,  $p < 0,01$ ;

#### 4.7. EFEITO DA *Baccharis illinita* SOBRE O PRURIDO INDUZIDO PELO COMPOSTO 48/80

A administração do composto 48/80 induziu intenso comportamento de coceira nos animais (FIGURA 20). A maior dose administrada do extrato em estudo (1000 mg/kg) foi capaz de reduzir de forma significativa a resposta causada pelo composto 48/80 em  $53 \pm 11\%$  enquanto que as doses menores não provocaram redução nesse comportamento.



**FIGURA 20.** Efeito do extrato bruto de *B. illinita* sobre o comportamento de prurido induzido pelo composto 48/80. Os animais receberam o extrato bruto de *B. illinita* por via oral uma hora antes de receber o agente indutor de prurido, composto 48/80 (100µg/100µL - sc). As barras representam a média ± E.P.M. do número de vezes que o animal apresentou o comportamento de prurido. (n=8-12)  
\*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle (V),  $p < 0,01$ .

## **5. DISCUSSÃO**

Desde muito tempo, os produtos naturais, procedentes das plantas, têm sido uma fonte importante de novos agentes terapêuticos. Cerca de 30% de todas as drogas utilizadas na terapêutica medicamentosa atual são derivadas de produtos naturais (plantas, bactérias e animais).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 70 – 80% da população mundial de países em desenvolvimento utilizam as plantas como recurso primário para a cura de sua doença, em decorrência da pobreza e falta de acesso à medicina moderna. No entanto, poucas plantas têm sido cientificamente estudadas para a avaliação de sua qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2005). Porém, nas últimas décadas, muitos trabalhos mostram a ocorrência de compostos naturais que interferem de maneira direta ou indireta em alvos para o desenvolvimento de medicamentos antiinflamatórios como: metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, fatores de transcrição nuclear, entre outros.

Entre essas plantas com grande potencial antiinflamatório estão incluídas aquelas pertencentes à família *Asteraceae* que é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo a cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Plantas dessa família são vastamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos (VERDI et al., 2005). Dentre as inúmeras plantas da família *Asteraceae* utilizadas na medicina caseira está a *Baccharis illinita* (*B. illinita*), conhecida também como “chá ventura” ou “erva milagrosa” e utilizada em inflamações, infecções e como cicatrizante de feridas cutâneas ou mucosas. Trabalhos realizados já demonstraram atividade anti-ulcerogênica e anticonvulsivante (BAGGIO et al., 2003).

As espécies do gênero *Baccharis* são arbustos como a carqueja, a vassoura ou vassourinha e medem em média de 0,5 a 4 metros de altura. São encontradas principalmente nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul e utilizado na forma de chás com indicação para diversos tipos de doenças. Por exemplo, *B. crispa* e a *B. notoserigila* são usadas para curar feridas e inflamações, a *B. genistelloides* é usada em distúrbios digestivos e do

fígado bem como malária, úlceras, diabetes, anemia, diarreia, inflamações urinárias, amigdalite, verminoses e mal de Hansen (MELO, 2001).

Muitas espécies do gênero *Baccharis* já foram estudadas quimicamente. De modo geral, os compostos que mais se destacam são os flavonóides, clerodanos, labdanos, kauranos, triterpenos, germacreno, ácidos cumáricos, tricotecenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. A *Baccharis illinita* possui grande quantidade de flavonóides e terpenos (VERDI et al., 2005). Os flavonóides são descritos como bons marcadores quimiotaxonômicos. No entanto, testes de atividade biológica realizados em extratos brutos e frações de plantas do gênero da *Baccharis* mostraram que a maioria das atividades não está relacionada aos flavonóides e sim aos terpenos e tricotecenos. Os diterpenos são compostos encontrados em maior quantidade no gênero *Baccharis* e são representados principalmente por neo e ent-clerodanos e menos comum, ent-labdanos e kauranos. Os triterpenos apresentam 103 ocorrências em 48 espécies de *Baccharis*, com 23 compostos diferentes, sendo representados principalmente pelo ácido oleanólico, descritos na literatura como agentes antiinflamatórios (VERDI et al., 2005 e HUNGUET et al., 2000).

Encontra-se na literatura muitos relatos sobre as espécies de *Baccharis* (OLIVEIRA et al., 2005; De FUNARI, et al., 2006; DICKEL, et al., 2007). No entanto, existem poucos estudos farmacológicos para a espécie *B. illinita*. Estudos realizados por Baggio et al. (2003) mostraram que a administração oral e intraperitoneal do extrato aquoso das flores, raízes e hastes bem como extrato hidroalcoólico de hastes e folhas da *B. illinita* promoveram uma ação protetora gástrica contra lesões da mucosa gástrica induzidas pelo etanol e indometacina.

Muitos dos usos populares da espécie *B. illinita* foram analisados cientificamente e esses dados demonstram que as espécies desse gênero se caracterizam pela presença de substâncias com potencial farmacológico bastante interessante, principalmente com relação à atividade antiinflamatória. Baseados nisso, diversos grupos de pesquisa se interessaram em investigar a ação de diversos extratos dessa planta, incluindo componentes ativos, foram testados em modelos experimentais como nocicepção, febre e efeitos gastoprotetores (BAGGIO, et al., 2003 e HARA, 2001). No entanto, não há relatos na literatura demonstrando sua ação frente a doenças inflamatórias cutâneas.

O presente estudo investigou o efeito redutor de processos inflamatórios cutâneos pela ação do extrato bruto, frações e compostos purificados, obtidos das folhas de *B. illinita*, em diferentes modelos animais de inflamação cutânea.

Entre os modelos de inflamação cutânea, destaca-se o edema de orelha, que utiliza uma metodologia simples e, além disso, pode ser induzido por inúmeros agentes irritantes. Entre as vantagens desse modelo pode-se destacar o fato de necessitar de pouca quantidade de amostras para estudos “in vivo”, além de permitir a obtenção rápida de resultados. E quando o objetivo é o desenvolvimento de novos fármacos para uso tópico estas vantagens são ainda maiores, visto que compostos com baixa absorção através da pele são identificados rapidamente. Sendo assim, esse modelo constitui um método importante para a investigação de novos medicamentos para doenças inflamatórias que acometem a pele (BOUCLIER et al., 1990; VANE, 2000).

O edema de orelha induzido pelo TPA (12 – O – tetracanoilforbol – 13 – acetato) é um modelo utilizado para avaliar a resposta inflamatória, uma vez que esse agente flogístico induz inflamação cutânea e hiperproliferação celular em animais, semelhantes a diversas doenças de pele como, por exemplo, a psoríase (GÁBOR, 2000).

Nesse modelo, entre os mediadores inflamatórios importantes estão os eicosanóides como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (RAO et al., 1993; PUIGNERO, 1997). Tanto inibidores de ciclooxigenase (COX) como de 5-lipooxigenase (LOX), e também antagonistas de LTB<sub>4</sub> inibem o edema causado pelo TPA (RAO et al., 1993; FÜRSTENBERGER, 1994). Com esses dados, sugere-se que os eicosanóides participam da inflamação induzida pelo TPA. No entanto o mecanismo pelo qual o TPA aumenta os níveis de eicosanóides ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que inclui a ativação de proteína quinase C (PKC), que por sua vez ativa outros grupos de enzimas como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) e fosfolipase A<sub>2</sub>, indução da COX -2 e ativação da LOX (WANG et al., 2001; KAST, 1993; SANCHEZ e MORENO, 1999; WERZ et al., 2001). O TPA induz vasodilatação, edema de orelha, eritema e agregação plaquetária que ocorre dentro de 2h. Leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) podem ser visualizados aderindo-se à parede do vaso em até 6h após a aplicação de TPA bem como a

presença da degranulação de mastócitos (YOUNG et al., 1983; YOUNG e De YOUNG, 1989). Entre 6 e 24h após a aplicação do agente flogístico, um grande número de leucócitos se acumula na derme (YOUNG et al., 1983; YOUNG e De YOUNG, 1989). A aplicação de TPA aumenta também os níveis de PGE<sub>2</sub> que possui o pico de concentração em 3 horas persistindo de forma gradual até 24 horas, também há aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  na qual se observa em 1,5 horas após a aplicação e alcança um pico em 4,5 horas retornando aos níveis basais em 24 horas (MURAKAWA, 2006).

Em adição a esse aumento de eicosanóides, o TPA parece induzir a expressão de citocinas proinflamatórias em queratinócitos, as quais também possuem algum envolvimento na inflamação da pele (WILMER et al., 1994; REDONDO et al., 1997).

Quando ocorre um estímulo inflamatório, os polimorfonucleares (PMNs-neutrófilos, eosinófilos e basófilos) são as primeiras células que extravasam dos vasos sanguíneos através da interação com a parede endotelial (PERRETTI, 1997). Os neutrófilos aderem às células endoteliais vasculares através de uma interação entre as moléculas de adesão presentes na célula endotelial, como por exemplo, a família das selectinas e ICAM (molécula de adesão intercelular), com integrinas presentes nos neutrófilos. A seguir, os neutrófilos migram para fora do vaso até o sítio inflamatório, atraídos por substâncias quimiotáxicas (LTB<sub>4</sub>, C5a, IL-8) (LIPOWSKY, 1996; SPRINGER, 1994). A migração de neutrófilos é um processo multimediado, regulado por vários mediadores liberados no sítio inflamatório. Esses mediadores incluem o LTB<sub>4</sub>, proteína complemento C5a, IL-8 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  cada qual atuando em fases específicas do processo de migração celular (ZIMMERMAN et al., 1996). Portanto, a liberação de citocinas como o TNF- $\alpha$  pode ser importante para a migração de neutrófilos observada no modelo descrito.

Estudos realizados por De Young (1989) demonstra que o edema e a infiltração celular causada pelo TPA acontecem em tempos distintos e podem ser diferentemente modulados pelos agentes farmacológicos. O padrão temporal do edema e a atividade de enzima marcadora de polimorfonucleares, mieloperoxidase – MPO foram examinados após a aplicação do TPA, sendo que o edema mantém-se até 64h, e a atividade da mieloperoxidase até 24h.

A aplicação tópica do extrato bruto de *Baccharis illinita* inibiu de maneira dose dependente o edema de orelha induzido pelo TPA bem como o glicocorticóide utilizado como controle positivo (dexametasona). O extrato foi capaz de reduzir a migração de polimorfonucleares para o local da inflamação apenas nas duas maiores doses. Em adição a esses resultados, a análise histológica de biópsias de orelhas de camundongos coletados 6h após a indução da inflamação com o TPA confirma de forma qualitativa, a redução do edema e a migração leucocitária promovida pelo extrato bruto bem como pela dexametasona. Estes dados sugerem, em parte, que o extrato bruto poderia estar interferindo na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , inibindo a síntese ou atividade da COX-2 e conseqüentemente a inibição da síntese/liberação de prostaglandinas ou ainda estar agindo diretamente na via da COX-2 e LOX.

Uma vez que o extrato bruto foi eficaz em reduzir o edema de orelha induzido pelo TPA, o próximo passo foi verificar qual a ação das diferentes frações obtida a partir do extrato bruto. Para tanto, o extrato foi submetido a fracionamento, de modo a promover a separação dos diferentes compostos presentes no extrato de acordo com suas polaridades em diferentes solventes orgânicos, iniciando o processo de caracterização de um provável grupo químico responsável pela atividade antiinflamatória do extrato. Deste modo obtivemos a fração hexano, a fração acetato de etila e a fração acetona e cada uma dessas frações foi testada no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA. De acordo com os resultados obtidos, todas as frações foram capazes de reduzir o edema de orelha promovido pelo TPA. Quando comparado com o grupo controle (TPA) o grupo que recebeu apenas o extrato bruto reduziu o edema em apenas 37%. Já aqueles que receberam as frações obtiveram percentual de redução maior, ou seja, em 82, 79 e 73% para as frações hexano, acetato e acetona respectivamente. Como todas as frações reduziram o edema de forma semelhante, a fração acetato de etila foi escolhida para iniciar o isolamento dos compostos ativos. A razão para a escolha desta fração se deve ao fato de que a quantidade dos compostos presentes é maior bem como a facilidade de purificação a partir desta fração.

Os compostos isolados obtidos para dar continuidade ao trabalho são os compostos terpenóides representados pelo ácido kaurenóico,  $\alpha$ -spinasterol, baurenol e ácido oleanólico. Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal, sendo que esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (FORMACEK e KUBECZA, 1982). Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpenos e os sesquiterpenos. Outros terpenóides, como os diterpenos, são encontrados apenas em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos (STEINEGGER e HANSEL, 1992). Dados da literatura demonstram a atividade antiinflamatória de compostos terpenóides, incluindo inibição de eicosanóides e da produção de citocinas, atividade da enzima hidrolítica, peroxidação lipídica (SAFAYHI e SAILER, 1997) e interação com muitas serina/tirosina quinase (HASMEDA et al., 1999). Em adição, Medeiros et al. (2007) e Otuki et al. (2005) demonstraram que  $\alpha$ -amirina (triterpeno pentacíclico) apresenta uma ação antiinflamatória tópica com início bastante rápido em modelos animais de edema de orelha induzida pelo TPA, provavelmente por inibir a expressão da COX-2. Estas evidências nos levaram a testar se estes compostos seriam pelo menos em parte, os componentes ativos responsáveis pela atividade antiinflamatória observada no extrato bruto da *B. illinita* bem como na fração acetato de etila.

Todos os compostos isolados obtidos da fração acetato de etila foram submetidos ao teste de edema de orelha induzido pelo TPA, e foram capazes de reduzir o extravasamento plasmático, porém, o ácido kaurenóico e o ácido oleanólico foram os compostos mais eficazes para essa resposta. Os efeitos antiinflamatórios do ácido oleanólico foram primeiramente descritos na literatura na década de 60 onde estudos realizados por Gupta et al. (1969) mostraram o efeito inibitório do ácido oleanólico sobre o edema de pata induzido pela carragenina bem como no modelo de artrite induzido pelo formaldeído. Esses resultados estão de acordo com a literatura onde Giner-Larza et al. (2001) mostram a ação antiinflamatória do ácido oleanólico obtido da *Pistacia terebinthus*, cuja ação, segundo os autores, é devido a um possível efeito inibitório da 5-Lipooxigenase (LOX). O ácido oleanólico e seu isômero, ácido ursólico, são compostos triterpenóides amplamente distribuídos nas plantas na

forma de ácido livre ou como agliconas de triterpenóides saponínicos (PRICE et al., 1987; MAHATO et al., 1988; WANG & JIANG, 1992). Estudos conduzidos por Wang & Jiang (1992) mostram que o ácido oleanólico foi isolado em mais de 120 espécies, como por exemplo, na *Calendula officinalis* L., *Panax ginseng* C.A.; *Aralia chinensis* L. entre outras. Posteriormente, outros estudos, mostraram a ação antiinflamatória do ácido ursólico isolado da *Rosmarinus officinalis* L no edema de orelha induzido por TPA (HIROTA et al., 1990; HUANG et al., 1994). Tanto o ácido ursólico como o ácido oleanólico por apresentar estrutura similar, possuem atividade farmacológica semelhante, por esta razão, plantas que possuem esses compostos são utilizadas na medicina popular como antiinflamatório, analgésico, cardiotônico, ansiolítico, protetor hepático entre outros (LIU, 1995).

Com relação ao ácido kaurenólico, não existem muitas informações na literatura. Estudos com *Copaifera* (BOAKYE-YIDOM et al., 1977) *Annoma* (DAVINO et al., 1989), *Mikania* (BATISTA et al., 1999) e *Xylopi*a (DE MELO et al. 2001) demonstraram que esses gêneros possuem atividade anti-parasitária e antimicrobiana, possivelmente relacionado à grande quantidade de ácido kaurenólico presente nessas plantas. O ácido kaurenólico é usado popularmente sob sua forma natural no tratamento de inflamação de garganta, infecção urinária e pulmonar e ainda, promover a cicatrização de úlceras e feridas (COSTA-LOTUFO et al., 2002). Em adição, o ácido kaurenólico produz instabilidade nas membranas celulares, e este efeito foi demonstrado quando o composto, isolado da *Copaifera langdorffi*, mostrou efeitos citotóxicos por promover inibição do crescimento de células tumorais bem como hemólise de eritrócitos em camundongos e humanos (COSTA-LOTUFO et al., 2002). Neste estudo, demonstramos que este composto isolado da *B. illinita* apresentou uma importante atividade antiinflamatória no modelo de edema de orelha induzido por TPA. Estudos mais aprofundados seriam necessários para evidenciar como o ácido kaurenólico estaria exercendo esta ação.

Mata et al. (1997) mostraram que o  $\alpha$ -spinasterol exerce uma inibição dose dependente da contração do íleo de ratos. Essa contração é regulada, primeiramente, pelo sinal intracelular de  $Ca^{+2}$ . Adicionalmente, já está bem estabelecido que o aumento citosólico de  $Ca^{+2}$  é a etapa limitante para a liberação de neurotransmissores, modulação da excitabilidade da membrana celular, bem

como a ativação de proteínas intracelulares (SOMLYO & SOMLYO 1994; WARD 2004). Existem evidências para participação de íons cálcio e de canais de cálcio na nocicepção (PRADO, 2001; CERVERO & LAIRD, 2003). Além disso, existem dados que indicam que os canais de cálcio expressos em neurônios nociceptivos primários viscerais parecem contribuir na sensibilização observado em estados de dor visceral (CEVERO & LAIRD, 2003). Em contribuição a esses achados, Meotti et al. (2006) mostraram a ação antinociceptiva do composto  $\alpha$ -spinasterol isolado da *Polygala sabulosa* no teste de contorções abdominais induzidos pelo ácido acético. Esse efeito antinociceptivo é provavelmente devido à inibição do influxo de cálcio ou bloqueio dos canais de cálcio proporcionado pelo  $\alpha$ -spinasterol. O  $\alpha$ -spinasterol também promoveu uma importante redução do edema de orelha induzido por TPA e esta atividade poderia estar relacionada com a redução dos níveis de  $Ca^{+2}$  intracelular.

Existem poucos relatos na literatura com relação à bioatividade do composto baurenol. Trabalhos realizados com compostos isolados de folhas de *Carmona retusa* (Vahl.) mostraram a presença de triterpenos como  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e baurenol e esses constituintes juntos apresentaram efeitos analgésicos e antiinflamatórios (VILLASEÑOR et al., 2002) por mecanismos não estabelecidos pelos autores.

Com os dados obtidos dos compostos isolados, esses foram submetidos à avaliação da migração leucocitária, através da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase. Apenas o ácido oleanólico foi capaz de reduzir a migração de células polimorfonucleares. Já está bem demonstrado que o ácido oleanólico foi capaz de inibir a produção de IL-1 $\beta$  em células mononucleares “in vivo” (MARQUEZ-MARTIN et al., 2006). Além disso, a produção de leucotrienos B<sub>4</sub> em leucócitos peritoneais de ratos foi reduzida pelo ácido oleanólico (GINER-LARZA et al., 2001). Estes estudos sugerem que a capacidade do ácido oleanólico em reduzir a atividade da mieloperoxidase ou o acúmulo de neutrófilos pode estar relacionada à inibição destes mediadores inflamatórios. Ainda, este efeito (redução da síntese de citocinas) do ácido oleanólico pode contribuir efetivamente para a redução do edema observado.

Portanto, é provável que a atividade anti-edematogênica do extrato bruto se deva a um efeito sinérgico destes compostos isolados. Ainda, estes compostos

parecem possuir mecanismos antiinflamatórios diferentes como, por exemplo, o ácido oleanólico que foi capaz de reduzir ambos (edema e migração celular) enquanto o ácido kaurenólico reduziu somente o edema. Este fato talvez explique a maior efetividade do extrato bruto em reduzir o edema do que a migração celular.

Prosseguindo os estudos com a *Baccharis illinita*, avaliamos sua ação frente aos edemas induzidos pela capsaicina bem como pelo ácido araquidônico. A capsaicina (8 – metil – N – vanilil – 6 – noneamida), é o princípio ativo da pimenta responsável pelos seus efeitos irritantes e pungentes. Desde a década de 40, a capsaicina tem sido descrita por muitos pesquisadores, como um agente capaz de induzir resposta inflamatória em modelos animais (GABÓR, 2000). Quando aplicada topicamente, observa-se uma resposta inflamatória neurogênica imediata caracterizada por extravasamento plasmático e conseqüente formação de edema. Diferentemente do edema induzido pelo TPA, a capsaicina exerce seus efeitos sobre um alvo específico, os receptores TRPV1, também localizados em fibras aferentes primárias do tipo C e parte das fibras do tipo A $\delta$ , produzindo resposta rápida através da liberação de neuropeptídeos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), taquicininas e as monoaminas como a histamina e a serotonina (BOUCLIER et al., 1990; GÁBOR & RAZGA, 1992). De acordo com a literatura (ERJAVEC et al., 1981 e FEWTRELL, 1982), a SP induz a resposta inflamatória pelo aumento da permeabilidade vascular diretamente pela liberação de aminas vasoativas de mastócitos, bem como ativação de receptores NK<sub>1</sub>. Por outro lado, a serotonina induz o extravasamento plasmático pela ação direta sobre a microvasculatura de ratos produzindo vasodilatação via receptor 5-HT<sub>1</sub> sobre os vasos sanguíneos (JAZAYERI et al., 1989). Inoue et al. (1995) demonstraram que bloqueadores de canais de Ca<sup>+2</sup> bem como antagonista de histamina (H<sub>1</sub>) foram capazes de reduzir o edema de orelha induzido por capsaicina, mas o mesmo não foi observado com inibidores dos metabólitos do ácido araquidônico, como a indometacina. Estudos preliminares do grupo mostraram que antagonistas de SP como *spandide* inibem o edema de orelha induzida pela capsaicina enquanto que antagonista de CGRP apresenta pouco efeito. Em nosso estudo, a *Baccharis illinita* não foi capaz de inibir a o edema induzido pela capsaicina, ou seja, o extrato parece não ter ação

sobre receptores específicos da capsaicina bem como não impede a ação de neuropeptídeos e monoaminas.

O ácido araquidônico (AA) e seus metabólitos estão associados com uma grande gama de doenças inflamatórias cutâneas como dermatite atópica e psoríase. Young et al. (1983) observaram, pela primeira vez, que a aplicação tópica de ácido araquidônico foi capaz de provocar uma intensa resposta inflamatória. A vasodilatação e a hiperemia provocadas pelo composto foram observadas após 5 minutos, enquanto que o edema pôde ser visualizado após 15 minutos com pico máximo em 60 minutos. Os principais produtos metabólicos do AA que estão envolvidos com processos inflamatórios são a PGE<sub>2</sub> e os leucotrienos C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>/LTD<sub>4</sub>) (CHANG et al., 1986). A PGE<sub>2</sub> é um potente vasodilatador e atua de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina. A PGE<sub>2</sub> intensifica a formação de edema e a infiltração de leucócitos, pelo aumento do fluxo sanguíneo no sítio inflamatório (LEE et al., 2003). Sanches e Moreno (1999) mostraram que a aplicação tópica do AA ou PGE<sub>2</sub> induz um aumento da expressão de COX-2. Em adição a esses resultados, Fischer (2002) mostrou que o tratamento de queratinócitos com PGs, aumentam a expressão das duas isoformas de COX através de vias de sinalização de AMPc. Os leucotrienos, produtos da lipooxigenase (LOX), também participam do processo inflamatório causando extravasamento vênular, mudanças no fluxo sanguíneo e eritema. Estudos realizados por Crummey (1987) demonstraram que inibidores da LOX foram capazes de reverter o edema orelha induzido pelo ácido araquidônico.

De acordo com os resultados obtidos, assim como no modelo do TPA, o extrato da *B. illinita* reverteu a resposta inflamatória do ácido araquidônico de forma semelhante à indometacina (inibidor da atividade da enzima COX). Esses dados sustentam os resultados obtidos no modelo do edema de orelha induzido pelo TPA, sugerindo que o extrato bruto parece interferir na biossíntese dos eicosanóides, pela inibição da COX ou ainda na biossíntese dos leucotrienos, pela inibição da LOX.

Com o intuito de avaliar a capacidade do extrato da *B. illinita* em reduzir a resposta inflamatória causada por estímulos que possuem mecanismos diferentes do TPA, o extrato foi testado no edema de orelha induzida pela oxazolona. A

aplicação tópica de oxazolona na epiderme mimetiza a hipersensibilidade de contato na qual duas fases são bem visualizadas: uma fase de sensibilização e outra fase de indução. Na fase de sensibilização, ocorre o primeiro contato com a oxazolona levando à expansão de células T. A oxazolona é captada pelas células de Langerhans (CL) e estas migram até os linfonodos, onde apresentam as moléculas do MHC associadas com a oxazolona para os precursores do linfócito T. Esses linfócitos T “sensibilizados” emigram dos linfonodos e caem na corrente sanguínea. Na fase de indução, que ocorre após um contato subsequente, a oxazolona é captada novamente pelas células dendríticas e apresentadas para as células T CD4<sup>+</sup> (associada a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II) bem como para as células T CD8<sup>+</sup> (associada a moléculas MHC da classe I). As células T CD4<sup>+</sup> se ligam ao antígeno e expressam receptores para IL-2 e também liberam a IL-2, induzindo a produção e a proliferação de células T<sub>helper</sub> nulas (Th0). As células Th0 podem se diferenciar em Th1 e Th2. A IL-4 induz a diferenciação das células à forma Th2 que secretam citocinas como a IL-4, TGF-β e IL-10 e são responsáveis pelo desenvolvimento das respostas imunológicas mediadas pelos anticorpos, ou seja, elas ativam as células B resultando em sua proliferação e produção final de células B de memória e plasmócitos, que passam a secretar os anticorpos. A IL-2 induz a diferenciação de Th0 em Th1, que por sua vez secretam outras citocinas (IL-2, TNF-β e IFNγ) que ativam os macrófagos além de estimularem a liberação de IL-2 por linfócitos CD8<sup>+</sup> (DEBENEDICTIS et al., 2001). A migração da LC e a disponibilidade dos sinais que induzem esta resposta são essenciais à iniciação da imunidade cutânea e entre esses sinais estão as citocinas epidérmicas como TNF-α e IL-1β. A administração intradérmica dessas citocinas causa uma redução na frequência de CL locais e sua posterior acumulação nos linfonodos (CUMBERBATCH e KIMBER, 1992). Animais estimulados com aplicação tópica de oxazolona e tratados com anticorpos específicos de TNF- α e IL-1β apresentaram inibição significativa do acúmulo de células dendríticas nos linfonodos (CUMBERBATCH e KIMBER, 1995).

Verificamos a ação da *B. illinita* na fase da sensibilização bem com na fase de indução da hipersensibilidade de contato proporcionada pela oxazolona. Primeiramente, os animais foram sensibilizados com a oxazolona e logo em

seguida tratados com o extrato. Nesse primeiro ensaio os animais foram novamente expostos à oxazolona, porém não receberam o tratamento. O tratamento com o extrato bruto de *B. illinita* somente na fase de sensibilização não modificou a resposta de hipersensibilização induzida pela oxazolona. Estes dados sugerem inicialmente que o extrato não possui ação na sensibilização, ou seja, o extrato parece não inibir citocinas pró-inflamatórias essenciais para a migração das CL, ligadas ao antígeno, para os linfonodos e assim impedir a expansão de linfócitos T e conseqüentemente sensibilizá-los. No entanto, resultados similares foram observados com a dexametasona. A dexametasona é um imunossupressor capaz de restringir a proliferação clonal de linfócitos T através da redução da transcrição de várias citocinas (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1). Uma possível justificativa para não visualizar esse efeito, nesse ensaio, é de que a dose administrada do imunossupressor foi muito baixa quando comparada com a dose administrada do hapteno, sendo assim, a dexametasona não foi capaz de reverter a sensibilização dos linfócitos T. Deste modo, o extrato, na dose utilizada, parece não ter ação preventiva contra a inflamação cutânea. Esses dados estão de acordo com a análise histológica, onde se observa, além do edema grande infiltrado celular (dados não mostrados).

Já está descrito na literatura que citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$ , e fatores de crescimento incluindo TGF- $\alpha$ , fator de crescimento derivado de plaqueta, fator de crescimento epidermal e fator de crescimento de fibroblasto induzem a expressão de COX-2 (RAZ et al., 1988 e GOPPELT-STRUEBE et al., 2000), desta forma, as PGs provenientes da ação da COX-2 participam da resposta inflamatória. Para prosseguir com o estudo verificamos a ação da *B. illinita* na fase de indução da hipersensibilidade de contato. O extrato preveniu a resposta inflamatória, tanto edema quanto migração leucocitária, causada pela oxazolona. Esse fato pode estar relacionado, em parte, com a inibição da síntese de citocinas e conseqüente inibição da indução da COX. Esses dados em conjunto com as respostas obtidas no modelo de TPA demonstram que a *B. illinita* é capaz de inibir tanto a resposta inflamatória imediata quanto a resposta de hipersensibilidade tardia.

Como muitas doenças de pele vêm acompanhada do sinal de prurido, investigamos o efeito da *B. illinita* sobre essa resposta. O prurido tem um grande

significado na qualidade de vida dos pacientes portadores de doenças de pele, como por exemplo, na dermatite atópica. O prurido, como uma reação de coceira, causa lesão na pele induzindo assim a inflamação, na qual, por sua vez, agrava ainda mais a sensação de prurido (SUGIMOTO, 2006). Muitos pesquisadores têm investigado quais são os mediadores e qual é o mecanismo de ação do prurido. Mediadores inflamatórios clássicos como bradicinina, serotonina, prostanóides, baixo pH e interleucinas são capazes de sensibilizar os nociceptores (HÄNGERMARK, 1977 e SCHMELZ, 2003). Recentemente levantou-se a hipótese de que a ativação de nociceptores a uma baixa frequência era capaz de induzir o prurido, enquanto que a alta ativação desses mesmos nociceptores induziria a nocicepção (SCHMELZ, 2001). No entanto, essa hipótese não explica a capacidade de baixas concentrações de algogênios não induzir o prurido e sim dor e por que altas concentrações de pruritogênios não causam dor e sim prurido. Sabe-se que um dos mediadores do prurido é a histamina, ou seja, a histamina ativa os nociceptores que por sua vez liberam neuropeptídeos como a substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), na qual via reflexos axonais induzem ao aparecimento de edema no local da aplicação. Quando a SP é injetada por via intradérmica em altas concentrações, ocorre a degranulação dos mastócitos causando a sensação desagradável de prurido (HÄNGERMARK, 1978). Antagonistas de receptores H<sub>1</sub> e AINEs são frequentemente usados na clínica com o intuito de diminuir o prurido.

Shinmei et al. (2004) mostrou o efeito do própolis brasileiro no prurido induzido pelo composto 48/80. Neste trabalho o extrato foi administrado por via oral e causou uma inibição dose – dependente nessa resposta bem como da liberação de histamina pelos mastócitos.

Não se observou efeito anti-pruritogênico quando o extrato foi administrado topicamente, no entanto, a *B. illinita* quando administrada por via oral foi capaz de reduzir o prurido induzido pelo composto 48/80, sugerindo que o extrato estaria atuando na inibição da liberação de histamina pelos mastócitos, ou atuando como antagonista de receptores histaminérgicos, ou ainda atuando na inibição da cascata das PGs.

Desta forma, os resultados obtidos nesse estudo, fornecem alguns subsídios científicos que justificam a utilização popular da *B. illinita* como

antiinflamatório bem como um grande potencial do extrato bruto e de seus compostos para o desenvolvimento de novas drogas antiinflamatórias de uso tópico e oral. Este efeito provavelmente advém de uma ação sinérgica de diferentes compostos encontrados no extrato.

## **6. CONCLUSÕES**

- O extrato bruto de *Baccharis illinita* possui um ou mais componentes capazes de promover o efeito antiinflamatório quando administrado topicamente em camundongos;
- O extrato bruto, bem como alguns de seus compostos isolados, ácido kaurenóico, ácido oleanólico,  $\alpha$ -spinasterol e, em menor grau, baurenol apresentaram um efeito antiedematogênico;
- Tanto o extrato bruto quanto o composto isolado, ácido oleanólico, reduziram a atividade da mieloperoxidase no modelo de edema de orelha induzido por TPA, sugerindo que este extrato e composto sejam capazes de reduzir a migração leucocitária.
- O edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico foi reduzido pela aplicação tópica do extrato bruto, sugerindo que a inibição da síntese de metabólitos do ácido araquidônico esteja envolvida no seu mecanismo de ação;
- O extrato não foi capaz de reduzir o edema induzido pela capsaicina, sugerindo que o extrato bruto não inibe a liberação de mediadores vasoativos como CGRP, SP, taquicininas, histamina e serotonina.
- O extrato bruto preveniu a resposta de hipersensibilidade tardia, sugerindo uma possível ação através da inibição da síntese de citocinas.
- O extrato parece possuir também uma atividade antiprurritogênica.

## REFERÊNCIAS

- ALBELDA, S. M.; BUCK, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. **FASEB J**, v. 4, p. 2868-80, 1990.
- ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W.; WARD, P. A. Adhesion molecules and inflammatory injury. **FASEB J**, v. 8, p. 504-12, 1994.
- AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **Dermatologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997.
- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacol Res**, v. 47, p. 93-98, 2003.
- BARNES, J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol. Sci**, v.14, p.436-40, 1993.
- BATISTA, R.; CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A. B. Trypanosomicidal kaurane diterpenes from *Widelia paludosa*. **Planta Med**, v. 65, p.283-284, 1999.
- BENYON, R. C.; ROBINSON, C; CHURCH, M. K. Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. **Br J Pharmacol** v. 97, p. 898-904, 1989.
- BERNARDINI, N.; SAUER, S. K.; HABERBERGER, R.; FISCHER, M. J.; REEH, P. W. Excitatory nicotinic and desensitizing muscarinic (M2) effects on C-nociceptors rat skin. **J Neurosci**, v. 21, p. 3295-3302, 2001.
- BERTH-JONES, J.; GRAHAM-BROWN, R. A. C. Failure of terfenadine in relieving the pruritus of the atopic dermatitis. **Br. J. Dermatol**, v. 121, p. 635-637, 1989.
- BHAGWAT, S. S.; MANNING, A. M.; HOEKSTRA, M. F.; LEWIS, A. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. **Drug Discov Today**, v. 4(10), p. 472-479, 1999.
- BOAKYE-YIADOM, K., FIAGBE, N. I., AYIM, J. S. Antimicrobial properties of some west African medicinal plants iv. Antimicrobial activity of xylopic acid and other constituents of the fruits of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae). **Lloydia**, v. 40, p.543-545, 1977.
- BOUCLIER, M., CAVEY, D., KAIL, N., HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacol. Rev**, 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. **J. Invest. Dermatol**, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BRUNETON, J. Pharmacognosy, **Phytochemistry and Medicinal Plants**. Ed. Lavosier, Paris, 1993.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L.; **GOODMAN & GILMAN**: As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

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

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

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

CALIXTO, J. B., SCHEIDT, C., OTUKI, M. F., SANTOS, A. R. S. Biological Activity of plants extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opin. Emerg. Drugs**, v. 6, p. 261-279, 2001.

CANDI, E., SCHMIDT, R., MELINO, G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. **Nat rev/mol cell boil**, v. 6, p. 328-340, 2005.

CAROLINE, S. K. Ichting and the atopic skin. **J. allergy clin immunol**, v. 104, p. 109-113, 1999.

CERVERO, F., LAIRD, J. M. A. Role of ions channels in mechanisms controlling gastrointestinal pain pathways. **Curr. Opin.Pharmacol**, v. 3, p. 608-612, 2003.

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

CHANDRASEKHARAN, N. V.; SIMMONS, D. The cyclooxygenases. **Genome Biology**, v. 5, p. 241, 2004.

CHANG, J., CARLSON, R. P., O'NEILL-DAVIS, L., LAMB, B., SHARMA, R. N., LEWIS, A. J. Correlation between mouse skin inflammation induced by arachidonic acid and eicosanoid synthesis. **Inflammation**, v. 10, p. 205-214, 1986.

CHI, K. H.; MYERS, J. N.; CHOW K. C.; CHAN W. K.; TSANG Y. W.; CHAO, Y. et al. Phase II trial systemic recombinant interleukin-2 in the treatment of refractory nasopharyngeal carcinoma. **Oncology**, v. 60, p. 110-115, 2001.

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? **Exp. Dermatol.**, v. 11, p. 159-187, 2002.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids **Nat. Prod. Rep.**, v.19 p. 494-513, 2002.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p.1231-1234, 2002.

CRAVO, A. R., TAVARES, V., SILVA, J. C. Terapêutica Anti-TNF alfa na espondilite anquilosante. **Act. Méd. Port.**, v.19, p.141-150, 2006.

CREMER B.; HEIMANN, A.; DIPPEL, E.; CZARNETZKI, B. M; Pruritogenic effects of mitogen stimulated peripheral blood mononuclear cells in atopic eczema. **Acta Derm. Venereol.**, v. 75, p. 426-8, 1995.

CRONQUIST, A. J. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York: Columbia University. p. 1021-1028, 1981.

CRONSTEIN, B. N.; WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 136 (2), p. 147-157, 1993.

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 Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

CUMBERBATH, M.; KIMBER, I. Dermal tumor necrosis factor- $\alpha$  induced dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides once stimulus for Langerhans cell migration **Immunology**, v. 75, p. 257-263, 1992.

CUMBERBATH, M.; KIMBER, I. Umor necrosis factor- $\alpha$  is required for accumulation of dendritic cells in training lymph nodes and for optimal contact sensitization. **Immunology**, v. 84, p. 31-35, 1995.

CUCÉ, L. C.; NETO, C. F. **Manual de dermatologia.** São Paulo: Atheneu, 2001.

CUMBERBATCH, M.; KIMBER, I. Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). **J Invest Dermatol.**, v. 99(5), p. 48-50, 1992.

CUMBERBATCH, M.; KIMBER, I. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. **Immunology**, v. 84(1), p. 31-5, 1995.

CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The release of neutrophil chemotatic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 129, p. 65-76, 1986.

CUNHA, F. Q.; SOUZA, G. E. P; FERREIRA, S. H. Macrophages stimulated with lipopolysaccharide release a selective neutrophil chemotactic factor: an vivo demonstration. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 19, p. 775-777, 1986.

CYBULSKY, M. I.; COLDITZ, I. G.; MOVAT, H. Z. The role of interleukin-1 in neutrophil leucocyte emigration induced by endotoxin. **Am. J. Pathol.**, v. 124, p. 367-372, 1986.

DAVINO, S. C., GIESBRECHT, A. M., ROQUE, N. F., Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivative substituted on carbon-15. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 22, p. 1127-1129, 1989.

DE FUNARI, C. S.; DE OLIVEIRA, V. F.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **J Ethnopharmacol.**, v. 111(2), p. 206-212, 2007.

DE MELO, A. C.; COTA, B. B.; DE OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopia* species. **Fitoterapia**, v. 72, p.40-45, 2001.

DDISEPIO, D.; CHANDRARATNA, R. A. S.; NAGPAL, S. Novel approaches for the treatment of psoriasis. **Therapeutics Focus**, v.4 (5), p. 222-231, 1999.

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 Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. Immune functions of the skin. **Clin Dermatol.**, v. 19(5), p. 573-585, 2001.

DEMLING, R. H; KRAMER, G.; HARMS, B. Role of thermal injury-induced hypoproteinemia on fluid flux and protein permeability in burned and nonburned tissue. **Surgery**, v. 95, p.136-144, 1984.

DEMLING, R. H; HARMS, B; KRAMER, G.; GUNTHER, R. Acute versus sustained hypoproteinemia and posttraumatic pulmonary edema. **Surgery**, v. 92, p. 79-86, 1982.

DENZLINGER, C; RAPP, S; HAGMANN W.; KEPPLER D. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. *Sci*, v. 230, p. 330-332, 1985.

DIAS-BARUFFI, M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Macrophage-released neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. **Agents and Actions**, v. 38, p. C54-C56, 1993.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M.; RITTER, M. R. Plants popularly used for looding weigth purpose in Porto Alegre, South Brazil. **J Ethopharmacol**, v. 109, p. 60-71, 2007.

EMERENCIANO, V. P.; MILITÃO, J. S. L. T.; CAMPOS, C. C.; ROMOFE, P.; KAPLAN, M. A. C.; ZAMBON, M.; BRANT, A. J. C.; Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae **Biochem. Syst. Ecol**, v. 29, p. 947, 2001.

ERGESTEN, A. Granules of human eosinophil leucocytes and their mobilization. **Clin Exp Allergy**, v.31, p. 1173-1188, 2001.

ERJAVEC F.; LEMBECK, F.; FLORJANC. T. I.; SKOFITSCH, G.; DONNERER, J.; SARIA, A.; HOLZER, P. Release of histamine by substance P. Naunyn Schmiedebergs **Arch Pharmacol**, v. 317, p. 67-70, 1981.

FEEWTRELL, C. M. S.; FEREMAN, J. C.; JORDAN, C. C.; OEHEME, P.; RENNER, H.; STEWART, J. M. The effect of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat. **J Physiol**, v. 330, p. 393-412, 1982.

FENG, L.; XIA, Y.; GARCIA, G. E.; HWANG, D.; WILSON, C. B. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and lipopolysaccharide. **J. Clin. Invest**, v. 95, p.1669-1675, 1995.

FISCHER, S. M. Is cyclooxygenase-2 important in skin carcinogenesis? **J Environ. Pathol. Toxicol. Oncol**, v. 21, p. 183–191, 2002.

FLOWER, R. J.; ROTHWELL, N. J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 15, p. 71-76, 1994.

FORMACEK, V.; KUBECZKA, K. H. **Essencial oils analisis by capillary gás chromatography and carbon – 13 NMR spectroscopy**. Chichester: John Wiley, 1982.

FRANCO, I. J. **Ervas e plantas: a medicina dos simples**. 5. ed. Chapecó: Imprimax, 1995.

FREINKEL, R. K.; WOODLEY, D. T. **The biology of the skin**. The Parthenon Publishing Group, 2000.

FRIEDL, H. P; TILL, G. O; TRENTZ, O.; WARD, P. A. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. **Am J Pathol.**, v. 135, p. 203-217, 1989.

DE FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; MATHOR, M.B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **J Ethnopharmacol**, v. 111(2), p. 206-212, 2007.

FÜRSTENBERGER, G.; GLÄNZER-CSUK, B. J.; MARKS, F.; KEPPLER, D. Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 2823-2827, 1994.

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

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

GIEMBYCZ, M. A.; LINDSAY, M. A. Pharmacology of the eosinophil. **Pharmacol. Review**, v. 51, p. 213-340, 1999.

GILROY, D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M., ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GUINER-LARZA E. M; MÁÑEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, M.; PRIETO, J. M.; NICOLÁS, M. C.; RÍOS, J. L. Oleanolic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. **Eur J Pharmacol**, v. 428, p. 137-143, 2001.

GOODWIN, J. S. Immunomodulation by eicosanoids and anti-inflammatory drugs, **Curr. Opin. Immunol**, v. 2, p. 264-268, 1989.

GOPPELT-STRUEBE, M.; REHM, M.; SCHAEFERS, H. J.; Induction of cyclooxygenase-2 by platelet-derived growth factor (PDGF) and its inhibition by dexamethasone are independent of NF-kappaB/IkappaB transcription factors, v. 361(6), p. 636-645, 2000.

GUPTA, M. B.; BHALLA, T. N.; GUPTA, G. P. MITRA, C. R. BHARGAVA, K. P. Antiinflammatory activity of natural products Triterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 67-70, 1969.

HANGERMARK O.; STRANDBERG, K.; HAMBERG, M. Potentiation of itch and a flare responses in human skin by prostaglandin E2 and H2 and a prostaglandin endoperoxide analog. **J Invest Dermatol**, v. 69, p. 527-530, 1977.

HANGERMARK, O.; HOKFELD, T.; PERNOW, B. Itch and flare induced by substance P in human skin. **J. invest dermatol**, v. 71, p.233-235, 1978.

HANGERMARK, O; WAHLGREN, C. F. Itch in atopic dermatitis: the roles of histamine and other mediators and the failure of antihistamine therapy. **Dermatol. Ther**, v.1, p, 75-82, 1996.

HANIFIN, J. M.; TOFTE, S. J. Update on therapy of atopic dermatitis. **J Allergy Clin. Immunol**, v. 104, p. 123-125, 1999.

HARA, M. **Avaliação das atividades analgésica, antipirética e antiinflamatória do extrato aquoso de caule de *Baccharis illinita* DC.** Monografia. Departamento de Farmacologia. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2001.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.; Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55(6), 481-504, 2000

HARLAN, J. M. Leucocyte-endothelial interations. **Blood**, v. 65, p. 513-519, 1985.

HASMEDA, M.; KWEIFIO.O. G.; MACRIDES, T.; POLYA, G. M.; Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Médica**, v. 64, p. 14-18, 1999.

HAWKEY,C. J. COX-1 and COX-2 inhibitors. **Best Pract & Res Clin Gastroenterol**, v. 15(5), p. 801-820, 2001.

HECKER, E.; SCHMIDT, R. Phorbol esters: the irrigants and co-carcinogens of *Croton Tiglium* L. **Fortschr Chem Organ Naturstoffe**, v. 31, p. 377-467, 1974.

HENNINO, A.; VOCANSON, M.; CHAVAGNAC, C.; SAINT-MEZARD, P.; DUBOIS, B.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. Fisiopatologia da dermatite de contato alergica: papel das celulas T CD8 efetoras e das células T CD4 regulatórias. **An Brás Dermatol**, v.80(4), p. 335-347, 2005.

HIROI, H. Pharmacological profile and clinical effect of tacrolimus ointment (Protopic ointment) for atopic dermatitis. **Nippon Yakurigaku Zasshi** v. 117, p.351-357, 2001.

HIROTA, M.; MORI, T.; YOSCHIO, M.; IRIYE, R. Supression of tumor promoter-induced inflammation of mouse ear by ursolic acid and 4,4-dimethylcholestame derivates. **Agri Biol chem.**, v.54, p. 1073-1075, 1990.

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

HUANG, M. T.; HO, C. T.; WANG, Z. Y.; FERRARO,T.; LOU, Y. R.; STAUBER, K.; MA, W.; GEORGIADES, C.; LASKIN, J. D.; CONEY, A. H. Inhibition of skin tumorigenis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. **Cancer Res**, v. 54., p. 701-708.

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

HUNGUET, A. L.; RECIO, M. C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R. M.; RÍOS, J. L. Effect of triterpenoids on teh inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally-accting irritants and other agents. **Eur. J.Pharmacol**, v. 410, p. 69-81, 2000.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Participation of serotonin in capsaicin-induced mouse ear edema **J. Pharmacol**, v. 69, p. 61-68, 1995.

JAZAYERI, A.; MEYER, W. J.; KENT, T. A. 5-HT<sub>1b</sub> and 5-HT<sub>2</sub> serotonin binding sites in cultures Wistar-Kyoto aortic smooth muscle cells. **Eur. J. Pharmacol**, v. 169, p. 183-187, 1989.

JOLY, A. B.; **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**, 7. ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, 1967.

JONES, D. A.; CARLTON, D. P.; McINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in the response to cytokines, **J. Biol. Chem**, v. 268, p. 9049-9054, 1993.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates. p. 369-401, 1999

KAST, R.; FÜRSTENBERGER, G.; MARKS, F. Phorbol ester TPA- and bradykinin-induced arachidonic acid release from keratynocytes is catalyzed by cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). **J Invest Dermatol**, v. 101, p. 567-572, 1993.

KISHIMOTO, T. K.; JUTILA, M. A.; BERG, E. L.; BUTCHER, E. C. Neutrophil MAC-1 and MEL-14, adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. **Science**, v. 245, p. 1238-1241, 1989a.

KISHIMOTO, T.K.; LARSON, R.S.; CORBI, A.L.; DUSTIN, M.L.; STAUNTUN, D.E.; SPRINGER, T.A. Leukocyte integrins. In: **Leukocyte adhesion molecules: structure, function and regulation**, 1989b

KLEIN, P. A.; CLARK, R. A. F.; An evidence-based review of the efficacy of antihistamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. **Arch. Dermatol**. v. 135(12), p. 1522-1525, 1999.

LARSON, R. S.; SPRINGER, T. A. Structure and functions of leucocyte integrins. **Immunol. Rev.**, v. 114, p. 181-217, 1990.

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.

LEWIS, A. J. **Pharmacological Methods in the control inflammation**. New York, p. 215-131, 1989

LEUNG, D. Y.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M. D.; NOMURA, I.; HAMID, Q. A. New insights into atopic dermatitis. **J Clin Invest.**, v. 113(5), p. 651-657, 2004.

LIPOWSKY, R. Adhesion of Membranes via Anchored Stickers. **Neurosci Lett**,

v. 3, p. 202-206, 1996.

LIU, F. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-69, 1995.

MACMILLIAN, R. M.; FOSTER, S. J. Leucotriene B<sub>4</sub> and inflammatory disease. **Agents and Actions**, v. 24, n. 1/2, p. 114-119, 1988.

MAHATO, S. B.; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, v. 27, p. 3037-3067, 1988.

MARNETT, L. J.; ROWLINSON, S. W.; GOODWIN, D. C.; KALGUTKAR, A. S.; LANZO, C. A.; Araquidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2: mechanism of catalysis and inhibition. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 22903-22906, 1999.

MARQUEZ-MARTIN, A.; De La PUERTA, R.; FERNANDEZ-ARCHE, A.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; YAQOOB, P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. **Cytokine**. v. 36(5-6), p. 211-217, 2006.

MARTIN, H. A.; MURPHY, P. R. Interleukin-2 activates a sub-population of cutaneous C-fiber polymodal nociceptors to interleukin-2. **Arch Physiol. Biochem**, v. 104, p. 229-238, 1996.

MASFERRER, J. L.; REDDY, S. T.; ZWEIFEL, B.; SEIBERT, K.; NEEDLEMAN, P. GILBERT, R. S.; HERSCHMAN, H. R. In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. **J. Pharmacol. Exper. Therap.**, v. 270 (3), p. 1340-1344, 1994.

MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; ZWEIFEL, B.; NEEDLEMAN, P. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 3917-3921, 1992.

MATA, R.; ROJAS, A.; ACEVEDO, L.; ESTRADA, S.; CALZADA, F.; ROJAS, I.; BYE, R.; LINARES, E. Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*, v. 63(1), p. 31-35, 1997.

MEOTTI, F. C.; ARDENGHI, J. V.; PRETTO, J. B.; SOUZA, M. M.; MOURA, J. A.; JUNIOR, A. C.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice **JPP**, v. 58, p.107-112, 2006.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C.; CALIXTO, J. B. Mechanism underlying the inhibitory action of the pentacyclic triterpene  $\alpha$ -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate **European Journal of Pharmacology**, v. 559(2-3), p. 227-235, 2007.

MELO, S. F.; SOARES, S. F.; COSTA, R. F.; DE OLIVEIRA MB, BEZERRA RJ, CALDEIRA-DE-ARAÚJO A, BERNARDO-FILHO M. Effect of the Cymbopogon

citratu, Maytenus ilicifolia and Baccharis genistelloides extracts against the stannous chloride oxidative damage in Escherichia coli. **Mutat Res.** v. 496(1-2), p. 33-38, 2001.

MENDONÇA, C.O, BURDEN, A.D. Current concepts in psoriasis and its treatment. **Pharmacol Ther. Review** v.99(2), p.133-147, 2003

MERLIE, J. P.; FAGAN, D.; MUDD, J.; NEEDLEMAN, P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase), **J. Biol. Chem**, v. 263, p. 3550-3553, 1988.

MING, W. J.; BERSANI, L.; MANTOVANI, A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leucocyte. **J. Immunol.**, v. 138(5), p. 1469-1474, 1987.

MIYAMOTO, T.; NOJIMA, H.; KURASHI, Y. Intradermal cholinergic agonist induce itch associated response via M3 muscarinic acetylcholine receptors in mice. **Jpn J Pharmacol**, v. 88, p. 351-354, 2002.

MONTAGNA W; PARAKKAL P. F. The pilary apparatus. In **The Structure and Formation of Skin**. New York: Academic Press, p. 172 - 258, 1974.

MUNDAY, J.; BLOOMFIELD, R.; GOLDMAN, M.; ROBEY, H.; KITOWSKA, G.J.; GWIEZDZISKI, Z.; WANKIEWICZ, A.; MARKS, R.; PROTAS-DDOZD, F.; MIKASZEWSKA, M. Chlorpheniramine is no more effective than placebo in relieving the symptoms of childhood atopic dermatitis with a nocturnal itching and scratching component. **Dermatol.**, v.205, p.40-45, 2002

MURAKWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-o-tetradecaoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice **Biochem Pharmacol**, v. 71, p.1331-1336, 2006.

NAKANO, T.; ARITA, H. Enhanced expression of group II phospholipase A<sub>2</sub> gene in the tissues of endotoxin shock rats and its suppression by glucocorticoid. **FEBS L.**, v. 273 (1/2), p. 23-26, 1990.

NAKAGAWA, H.; ETOH, T.; ISHIBASCHI, Y.; KAWASHIMA, M.; TORRI, H.; HARADA, S. Tracolimus ointment for atopic dermatitis. **Lancet**, v. 344, p. 883, 1994.

NEWMAN, S. P.; FLOWER, R. J.; CROXTALL, J. D. Dexamethasone suppression of IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase 2 expression is not mediated by lipocortin-1 in A549 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 202(2), p. 931-939, 1994.

O'BANION, M. K.; WINN, V. D.; YOUNG, D. A. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 4888-4892, 1992.

OHKUBO, T.; SHIBATA, M.; INOUE, M.; KAYA, H.; TAKAHASHI, H. Regulation of substance P release mediated via prejunctional histamine H3 receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 273, p. 83-88, 1995.

OHMURA T.; HAYSCHI, T.; SATOH, Y.; KONOMI, A.; JUNG, B.; SATO, H. Involvement of substance P in scratching behavior in an atopic dermatitis model. **Eur J Pharmacol**, v. 491, p. 191-194, 2004.

OLIVEIRA, A. C. P.; ENDRINGER, D. C.; AMORIN, L. A. S.; BRANDÃO, M. G. L.; COELHO, M. M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and no-diabetic mice. **J Ethnopharmacol**, v. 1002, p. 465-469, 2005.

OTUKI, M.F.; LIMA, F.V.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and  $\alpha$ -amirin pentacyclic triterpene **Eur J Pharmacol**, v. 507, p. 253-259, 2005

PERRETTI, M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction, **TiPS**, v. 18, p. 418-425, 1997.

PRADO, W. A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 34, p. 449-461, 2001

PRICE, K. R.; JOHNSON, L. T.; FENWICK, G. R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuff. **Crit Rev Food sci Nutr** v. 26, p. 27-135, 1987.

PUIGNERO, V., QUERALT, J. Effect of topically applied cyclosporin A on arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation in mouse ear. **Inflammation**, v. 21, p. 357-369, 1997.

RAO, Y. S.; CURRIE, J. L.; SCAFFER, A. F.; ISAKSON, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, p. 723-741, 1993.

RAZ, A.; WYCHE, A.; SIEGEL, N.; NEEDLEMAN, O. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. **J Biol Chem**, v. 263, p. 3022-3028, 1988.

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

REDONDO, P.; GARCIA-FONCILLAS, J.; ESPANA, A.; GUEVILLAS, F.; QUINTANILLA, E. Differential modulation of IL-8 and TNF- $\alpha$  expression in human keratinocytes by buflomedil chlorhydrate and pentoxifylline **Exp Dermatol** v. 6, p. 186-194, 1997

REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Steroidal and Triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata* **J. Braz. Soc.**, v. 12(1), p. 32-36, 2001.

RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunol**, v. 73, p. 472-475, 1991.

RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. **Int. J. Exp. Path.**, v. 71, p. 717-725, 1990.

ROCHA e SILVA, M. A brief history of inflammation. In: VANE, J.R.; FERREIRA S. H. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer-Verlag, v. 50(1), p. 6-25, 1978.

ROWSE, D. H., EMMETT, E. A. Solvents and the skin. **Clin. Occup. Environ. Med**, v. 4, p. 657-730, 2004.

RUKWIED, R.; HEYER, G. Administration of acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide to atopic eczema patients. **Exp Dermatol**, v. 8, p. 39-45, 1999.

PAIVA, L. A.; GURGELLA, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N, v.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, U. S. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera landsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats **Vascul. Pharmacol**, v. 39(6), p. 307, 2002

SAFAYHI, H.; SAILER, E. R.; Antiinflammatory actions of pentacyclic triterpenes **Planta Méd**, v. 63, p. 487-493, 1997

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2 ed. São Paulo: Arte Médica, 2000.

SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Scie**, v. 220(4597), p. 568-575, 1983.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of prostaglandin H-synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol éster application on skin. **Prostaglandin Othe Lipid Mediat**, v. 57, p. 119-131, 1999.

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. **J. Immunol.**, v. 173 p. 2151-2158, 2004.

SCHILLER, M.; METZE, D.; LUGER, T. A.; GRABBE, S.; GUNZER, M. Imune response modifiers: mode of action. **Exp Dermatol**, v. 15, p. 331-341, 2006.

SCHMELZ, M. Itch. Mediators and mechanism. In: **J Dermatol Sci**, v. 28, p. 91-96, 2002.

SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; WEIDNER, C. HILLIGES, M.; TEREBJÖRK, H. E.; HANDWERKER, H. O. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. **J. Neurophysiol**, v. 89, p. 2441-2448, 2003.

SCHMELZ, M. A. A neural pathway for itch. **Nat Neurosci**, v. 4, p. 9-10, 2001.

SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: Handbook of inflammation. BONTA, I. L.; BRAY, M. A.; PARNHAM, M. J. (ed.), Elsevier, v. 5, p. 27-47, 1985.

SHERWOOD, E. R.; KINSKY, T. T. Mechanism of the inflammatory response. **Best pract&Res Clin Anaesthesiol**, v. 18(3), p. 385-405, 2004.

SHINMEI, Y.; HOSSEN, M. A.; OKIHARA, K.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H.; KAMEI, C. Effect of Brazilian propolis on scratching behavior induced by compound 48/80 and histamine in mice International **Immunopharmacol** v. 4, p. 1431-1436, 2004.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition, **Pharmacol. Rev**, v. 56, p. 387-437, 2004.

SINGER, A. J., CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med**, v. 341, p. 738, 1999.

SMITH, W. B.; GAMBLE, J. R.; CLARK-LEWIS, I.; VADAS, M. A. Interleukin-8 induces neutrophil transendotelial migration. **Immunol.**, v. 72, p. 65-72, 1991.

SOARES, M. A. Medicamentos não prescritos. Lisboa: Publicações Farmácia Portuguesa, 1995.

SOMLYO, A. P., SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nat**, v. 372, p. 231-236, 1994.

SOTER, N. A. Physical urticaria/angioedema as an experimental model of acute and chronic inflammation in human skin. Springer Semin. **Immunopathol.**, v. 4, p. 73-81, 1981.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophil into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nat**, v. 346, p. 425-34, 1990.

\_\_\_\_\_. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301-314, 1994.

SPRINGER, T. A.; ANDERSON, D. C.; ROSENTHAL, A. S.; ROTHLEIN, R. (eds.), New York, Springer Verlag, p. 7-43, 1989b.

STADNYK, A. W.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. **Parasitol Today**, v. 7, p. A7-A12, 1991.

STANDER, S.; STEINHOFF, M.; SCHMELZ, M.; WEISSHAAR, E.; METZE, D.; LUGER, T. Neurophysiology of pruritus: cutaneous elicitation of itch. **Arch. Dermatol**, v. 139, p. 1463-1470, 2003.

STEINEGGER, E.; HÄNSEL, R. **Pharmakognosie**, 5 ed. Berlin: Springer, 1992.

SUGIMOTO, M.; ARAI, I.; FUTAKI, N.; HONMA, Y.; SAKURAI, T. HASHIMOTO, Y.; NAKAIKE, S. Putative mechanism of the itch-scratch circle: Repeated scratching decreases the cutaneous level of prostaglandin D2, a mediator that inhibits itching. **Prostaglandins Leukot Essencial Fatty Acids**, v. 76(2), p. 93-101, 2007.

SUZUKI, R.; FURUNO, T.; MCKAY, D. M. Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via neuropeptide substance P. **J Immunol**, v. 163, p. 2410-2415, 1999.

TWCROSS, R.; GREAVES, M. W.; HANDWERKER, H. Itch: scratching more than the surface. **QJM**, v. 96, p. 7-26, 2003.

UEDA, Y.; INOUE, T.; RAHMAN, A.; YATSUZUKA, R.; JIANG, S.; KAMEI, C. A new chronic itch model accompanied by skin lesions in hairless mice. **International immunopharmacol**, v. 6, p.1609-1615, 2006.

VANE, J. In: Gábor M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó 11, 2000.

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

VERDI, L. G., BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Genero Baccharis (ASTERACEAE): Aspectos químicos, económicos e biológicos. **Quím. Nova**, v. 28(1), p. 85-94, 2005.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; SCHRIPSEMA, J.; FILHO, R. B.; PIZZOLATTI, M. G. Kaurene diterpenes and flavanoids from *Baccharis illinita* flowers Biochem. **System ecol**, v. 32, p. 837-840, 2003.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects **Quím. Nova** v.28(1), 2005.

VIEIRA, H. S.; TAKAHASCHI, J. A.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E.; BOAVENTURA, M. A. Novel derivatives of Kaurenoic Acid: Preparation and Evaluation of their Trypanocidal Activity **J. Braz. Chem. Soc.**, v.13(2), p.151-157, 2002.

VILLASEÑOR, I. M.; CANLAS, A. P.; FAUSTINO, K. M.; PLANA, K. G. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. **J Ethnopharmacol.** v. 92(1), p. 53-6, 2004.

VOGELSANG, M.; HEYER, G.; HORNSTEIN, O. P.; Acetylcholine induces different cutaneous sensations in atopic and non –atopic subjects. **Acta Derm Venereol.**, v. 75, p. 434-436, 1995.

WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochem Int.**, v.26 p.1-16, 1995.

WANG, B.; JIANG, Z. H. Studies on oleanolic acid **Chin Pharmaceut J** v. 27, p. 393-397, 1992.

WANG, H. Q.; KIM, M. P.; TIANO, H. F. LANGENBACH, R.; SMART, R. C. Protein kinase C- $\alpha$  coordinately regulates cytosolic phospholipase A (2) activity and the expression of ciclooxigenase-2 through different mechanism in mouse keratinocytes. **Mol Pharmacol.**, v. 59, p. 860-866, 2001.

WARD, D. T. Calcium receptor-mediated intracellular signalling. **Cell Calcium** v. 35: p. 217–228, 2004.

WERZ, O.; KLEMM, J.; SAMUELSSON, B.; RADMARK, O. Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leucocytes **Blood**, v. 97, p. 2487-94, 2001.

WILKINSON, P.C. Cellular accumulation and inflammation. In: Textbook of Immunopharmacology. DALE, M. M.; FOREMAN, J. C.; FAN, D. (eds.), 3<sup>a</sup> edição, Oxford, Blackwell Scientific Publication, cap. 19, p. 218-31, 1994.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sci.**, 58(18), p. 1485-507, 1996.

WILLIAMS, H. C. Atopic Dermatitis. **N Engl J Med**, v. 352(22), p. 2314-2324, 2005.

WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KANNO, J.; LUSTER, M. I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin **J Invest Dermatol** v. 102, p. 915-922, 1994.

WOODWARD D. F., NIEVES A. L., HAWLEY S. B., JOSEPH R., MERLINO G. F., SPADA C. S. The pruritogenic and inflammatory effects of prostanoid in the conjunctiva. **J ocul Pharmacol Therapy** v. 11, p. 339-347, 1995.

WOODWARD D. F., NIEVES A.L., HAWLEY S. B., JOSEPH R., MERLINO G. F., SPADA C. S.; YANCEY, K. B. Biological properties of human C5a: selected "in vitro" and "in vivo" studies. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 71, p. 207-210, 1988.

YOSIPOVITCH G, GREAVES M. W., SCHMELZ M. Itch. **Lancet**, v.361 p. 690-694, 2003.

YOSIPOVITCH G.; ADEMOLA, J.; PING, L. Topically applied aspirin rapidly decrease histamine induced itch. **Acta Derm Venerol**, v. 77, p. 46-48, 1997.

YOUNG, J. M. WAGNER, B. M.; SPIRES, D. A. Tachyphylaxis. In: 12-O-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. **Invest Dermatol** v. 80, p. 48-52, 1983.

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

YOUNG, J. M.; DE YOUNG, L. M. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. In: Chang, J. Y., Lewis, A. J. (Eds.). *Modern Methods in Pharmacology 5. Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*. Alan R. Liss, New York, NY. p. 215-231, 1989.

ZIMMERMAN, G. A., ELSTAD, M. R., LORANT, D. E., McINTYRE, T. M., PRESCOTT, S. M., TOPHAN M. K.,WEYRICH, A. S. e WHATLEY,R. E. Plateletactivating factor (PAF) signaling and adhesionin cell-cell interactions. **Adv Exp Med Biol**, v. 416, p. 269-304, 1996.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, p. 109-110, 1983.