

ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE

**O PAPEL DA *Malva sylvestris* EM MODELOS INFLAMÁTORIOS DE PELE  
DE CAMUNDONGOS**

CURITIBA  
2010

ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE

**O PAPEL DA *Malva sylvestris* EM MODELOS INFLAMÁTORIOS DE PELE  
DE CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Daniela de  
Almeida Cabrini

CURITIBA  
2010

*Este prefácio, apesar de interessante, inútil. Alguns dados. Nem todos. Sem conclusões. Para quem me aceita são inúteis ambos. Os curiosos terão prazer em descobrir minhas conclusões, confrontando obra e dados. Para quem me rejeita trabalho perdido explicar o que, antes de ler, já não aceitou.[...] Mas todo esse prefácio, com todo o disparate das teorias que contem, não vale coisíssima nenhuma.*

*Mario de Andrade*



1 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

2 Ao décimo primeiro dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e dez, às quatorze  
3 horas, no Anfiteatro nº 10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do  
4 Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria do pós-  
5 graduando em Farmacologia **ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE** intitulada: "O  
6 PAPEL DA *Malva sylvestris* EM MODELOS INFLAMATÓRIOS DE PELE DE  
7 CAMUNDONGOS", sob orientação do Prof. Dr. Michel Otuki e composta pelos  
8 professores: Prof. Dr. Michel Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof. Dr. Juliano  
9 Ferreira (UFSM); Profª. Drª. Maria Fernanda de Paula Werner (UFPR). A Banca  
10 Examinadora iniciou os trabalhos. O candidato teve quarenta e cinco minutos para expor  
11 oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos  
12 membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das argüições. No  
13 final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: aprovado. De  
14 acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-  
15 graduando foi aprovado. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações  
16 sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o  
17 Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada  
18 pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 11 de  
19 fevereiro de 2010.

20  
21  
22

Prof. Dr. Michel Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof. Dr. Juliano Ferreira (UFSM)

Profª. Drª. Maria Fernanda de Paula Werner (UFPR)



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



## PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado "O PAPEL DA *Malva sylvestris* EM MODELOS INFLAMATÓRIOS DE PELE DE CAMUNDONGOS", de autoria do pós-graduando **ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE**, sob orientação do Prof. Dr. Michel Otuki e composta pelos professores: Prof. Dr. Michel Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof. Dr. Juliano Ferreira (UFSM); Prof. Dr.ª Maria Fernanda de Paula Werner (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi aprovado. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Em Curitiba, 11 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Michel Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof. Dr. Juliano Ferreira (UFSM)

Prof. Dr.ª Maria Fernanda de Paula Werner (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Mauricio e Carime e irmão Bruno por me incentivarem todos estes anos morando longe e buscando meus objetivos, apoio este com muito amor, dedicação, desentendimentos e acertos. Obrigado por ter acreditado e me financiarem por um longo tempo.

A minha querida e amada Juliana, a qual me agüenta todos esses anos longes, sofrendo com a saudade, aturando minha intolerância, meus momentos de chatice e tudo mais. Obrigado por me esperar sempre e quem sabe esperar mais um pouco.

Aos meus estimados orientadores Michel e Dani que acreditaram no meu potencial, nos meus esforços e me aceitaram em seu laboratório sem se quer me conhecer. Agradeço imensamente por esses anos de aprendizagem que obtive com vocês e desculpe pelos relatórios atrasados artigos inacabados e demais problemas causados.

Aos milhares de amigos conquistados sem os quais não teria agüentado tanto tempo e nem se quer conseguido realizar este trabalho. Alliete, Cintia, Daniel, Evelise, Jaqueline, Laryssa e Shirley obrigado por terem me ensinado o que sei dentro do laboratório, em especial a Jaque pois sem você eu não estaria trabalhando com inflamação. Amanda, Andre Tw., Cris Setim, Cris Baggio, Diogão, Fernando (Tigrão), Fran, Francis ou Ney, Jana, Prof Paulo, Stefani agradeço as festas, os congressos e muitos aprendizados tanto de

cunho acadêmico como sem motivo algum. Marcelo Miller (Tio), Dayane, Ana Pitarelo, pela agradável convivência ao longo destes anos. E para encerrar meus grande amigos da minha estimada terra natal da qual ostento um apelido “Bauru”, Pião, Renan, Bill, Rodrigo, Pexe, e todos outros. A todos vocês meus sinceros obrigado.

E sem esquecer agradeço aos camundongos que deram a vido por esse trabalho e a CAPES, o programa REUNI, Fundação araucária os quais financiaram este trabalho.

## RESUMO

A *Malva sylvestris* é uma planta herbácea, dispersa pelos continentes europeu, africano e americano. No Brasil é cultivada nas regiões sul e sudeste, sendo utilizada na medicina popular no tratamento de tosse e doenças inflamatórias principalmente em mucosa. Estudos realizados anteriormente mostram a atividade da *M. sylvestris* como analgésica, cicatrizante, antioxidante entre outros, no entanto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato etanólico da *M. sylvestris*, duas frações e a resina, em modelos inflamatórios cutâneos. A atividade de do extrato etanólico da folhas, foi avaliada nos modelos de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), ácido araquidônico (AA) e oxazolona em camundongos Swiss fêmeas (20-30 g; N=5-10). A aplicação tópica do EEMS foi capaz de impedir a formação do edema provocado pelo TPA (DI50  $\approx$  0,36 mg/orelha) obtendo na maior dose ( 3,0 mg/orelha) uma inibição de  $77 \pm 6$  %. Neste modelo também se verificou a migração leucocitária avaliada pela atividade da mieloperoxidase (MPO) onde na dose de 3,0 mg/orelha a redução foi completa da migração (DI50  $\approx$  0,46), sendo que, esta análise foi confirmada através de cortes histológicos, para melhor entendimento da ação do EEMS foi avaliado os níveis de IL-1 $\beta$  no tecido onde o EEMS na maior dose também foi capaz de reduzir por completo os níveis desta citocina, causando uma inibição dose dependente (DI50  $\approx$  0,96 mg/orelha). Na tentativa de verificar que tipo de compostos é responsável por essa inibição foi testado no modelo do TPA duas frações (fração aquosa e acetato de etila) de polaridades diferentes e a resina



onde a fração aquosa teve inibição e 31,4%, a fração acetato de etila 89,3% e a resina 53,5%, todas estas inibições calculadas na maior dose testada. No modelo do AA o EEMS foi capaz de impedir o aumento da espessura da orelha de forma dose dependente (DI50  $\approx$  0,39 mg/orelha) com uma inibição significativa na dose de 3,0 mg/orelha, assim como no modelo da oxazolona onde nas primeiras 24 h a redução causada pelo EEMS foi de  $49 \pm 5$  %, perdurando até as 96 h, sendo que, neste ponto a inibição foi de  $65 \pm 14$  %.

**Palavras-chave:** *Malva sylvestris*; inflamação; pele; TPA; edema de orelha.

## ABSTRACT

The *Malva sylvestris* is a herbaceous plant spread in Europe, Africa and America. In Brazil it is grown in the south and southeast, and is used in folk medicine to treat coughs and inflammatory diseases especially in mucosa. Previous studies show the activity of *M. sylvestris* as analgesic, wound healing, antioxidant among others, however the objective of this study was to evaluate the effect of ethanol extract of *M. sylvestris*, two fractions and the resin in cutaneous inflammatory models. The activity of the ethanol extract of the leaves was evaluated in models of ear edema induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), arachidonic acid (AA) and oxazolone in female Swiss mice (20-30 g, N = 5-10). Topical application of EEMS was able to prevent edema formation caused by TPA (ID<sub>50</sub> ≈ 0.36 mg / ear) getting the highest dose (3.0 mg / ear) an inhibition of 77 ± 6%. This model is also the case evaluated by leukocyte migration activity of myeloperoxidase (MPO) where a dose of 3.0 mg / ear reduced the migration was complete (ID<sub>50</sub> ≈ 0.4 mg / ear), and that analysis was confirmed by cutting histological findings to better understand the action of EEMS was evaluated levels of IL-1β in the tissue where the EEMS at the highest dose was also able to completely reduce the levels of cytokines, causing a dose-dependent inhibition (ID<sub>50</sub> ≈ 0.96 mg / ear). In an effort to see that type of compounds is responsible for this inhibition was tested in the TPA model of two fractions (aqueous fraction and ethyl acetate) of different polarities and resin in which the aqueous fraction was 31.4% inhibition and the ethyl acetate fraction 89.3% and 53.5% resin, all these inhibitions calculated at the highest dose tested. In the model of the EEMS AA was able to prevent an

increase in ear thickness in a dose dependent ( $ID_{50} \approx 0.39$  mg / ear) with significant inhibition at doses of 3.0 mg / ear, as well as the model of oxazolone where the first 24 ha reduction caused by EEMS was  $49 \pm 5\%$ , lasting until 96 h, and at this point the inhibition was  $65 \pm 14\%$ .

**Key words:** *Malva sylvestris*; inflammation; skin; TPA; ear oedema.

## Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Inflamação	2
1.2. Fisiopatologia de doenças Cutâneas	4
1.3. Produtos naturais como alvos terapêuticos	15
1.4. Malva sylvestris	16
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Especificos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	25
3.2 Avaliação do edema de orelha	25
3.3 Edema de orelha induzido pela aplicação de TPA	26
3.4 Atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)	27
3.5 Quantificação de IL-1 $\beta$ tecidual	28
3.6. Análise histológica	28
3.7 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico	29
3.8 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica da oxazolona	29
3.6 Análise Estatística	30
4. RESULTADOS	33
4.1 Edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate (TPA)	33
4.2 Ensaio da atividade da MPO	36

4.3 Análise histológica	38
4.4 Quantificação de IL-1 $\beta$ tecidual	40
4.5 Indução de edema de orelha por ácido araquidônico	42
4.6 Indução de edema de orelha por oxazolona	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AcOEt	Acetato de etila
APC	Células apresentadoras de antígenos
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase do tipo 2
Dexa	Dexametasona
DI50	Dose capaz de inibir a resposta em 50%
EEMS	Extrato etanólico de <i>Malva sylvestris</i>
EPM	Erro padrão da média
FDA	Food and Drug Administration
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HTAB	Hexadeciltrimetilamônia
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzida
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
mDO	mili-Densidade Óptica
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo II
MPO	Mieloperoxidase
NF- $\kappa$ B	Fator de Transcrição Nuclear- Kappa B

OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina tamponada de fosfato
PG	Prostaglandina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostraciclina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PMN	Polimorfonucleares
PMSF	Fluoreto de feniltmetilsulfonila
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Th	T auxiliar
TMB	Tetrametilbenzidina HCl
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato
UVB	Ultravioleta B

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema simplificado de uma secção transversal de pele.	5
<b>Figura 2:</b> Esquema simplificado de uma secção transversal da epiderme	6
<b>Figura 3:</b> <i>Malva sylvestris</i>	177
<b>Figura 4:</b> <i>M.sylvestris</i> L. ilustrada por Johann Georg Sturm	18
<b>Figura 5:</b> Efeito do EEMS administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA.	34
<b>Figura 6:</b> Efeito de diferentes frações da <i>M. sylvestris</i> administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA.	35
<b>Figura 7:</b> Atividade da MPO do EEMS após a indução do edema de orelha por TPA.	43
<b>Figura 8:</b> Avaliação histologica do efeito do EEMS administrado topicamente após a indução do edema de orelha por TPA.	45
<b>Figura 9:</b> Efeito do EEMS administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA na Produção de IL-1 $\beta$ .	37



**Figura 10:** Efeito do EEMS administrado topicamente na indução do edema de orelha por AA. 41

**Figura 11:** Efeito do EEMS no modelo de hipersensibilidade tardia induzido pela oxazolona. 39

# Introdução

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta à infecção, ao antígeno ou lesão do tecido que ocorre para eliminar os microorganismos ou irritantes e potencializar a reparação tecidual. Ela pode ser dividida em duas categorias principais, aguda e crônica, com base no tempo e nas características fisiopatológicas (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). Os processos inflamatórios agudos são geralmente de duração relativamente curta (horas ou dias) e são caracterizados por vasodilatação, extravasamento de líquido rico em proteínas (plasma) e migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos, no local da lesão (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). Já os distúrbios inflamatórios crônicos são caracterizados por uma duração prolongada (semanas, meses ou anos) onde a destruição tecidual e tentativa de reparação tecidual está ocorrendo simultaneamente. A infiltração de células mononucleares e fibrose são características histológicas típicas na inflamação crônica (DAVIES, 2003).

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

artrite reumatóide entre outras (DEBENEDICTIS *et al.* 2001; ROBERT & KUPPER, 1999). Desta forma, é necessária a manutenção do equilíbrio entre os efeitos benéficos e o potencial de persistência que, a longo prazo, pode promover a destruição tecidual (SIMMONS, 2006).

Em seu caráter benéfico, a inflamação começa imediatamente após uma lesão com alterações nos vasos sanguíneos que levam a liberação de células e elementos provenientes do sangue resultando na formação do coágulo. O primeiro a atuar no processo inflamatório são as plaquetas, que formam o coágulo e também liberam fatores quimiotáticos e atraem outras plaquetas e leucócitos para área lesada. A fase inflamatória continua com os leucócitos, especificamente os neutrófilos e macrófagos, estes por sua vez têm papel de fagocitar, debelar bactérias e retirar os restos celulares (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

Alterações vasculares citadas anteriormente iniciam com a dilatação de pequenas arteríolas, resultando em um aumento do fluxo sanguíneo, seguido por uma redução do fluxo e eventual estase de sangue, seguida de um aumento da permeabilidade das vênulas pós capilares com exsudação de líquido. A vasodilatação é efetuada por mediadores, como a histamina, prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> (prostaciclina), produzidas através da interação do microorganismo com o tecido, podendo atuar com juntamente com as citocinas na permeabilidade vascular (RANG *et al.*, 2007).

Já a migração de leucócitos é regulada por duas classes de mediadores, as moléculas quimiotáticas (tais como citocinas, quimiocinas bioativas e lipídios) e proteínas de aderência (ou seja, integrinas e selectinas). As quimiocinas fazem parte de uma superfamília de proteínas de baixo peso

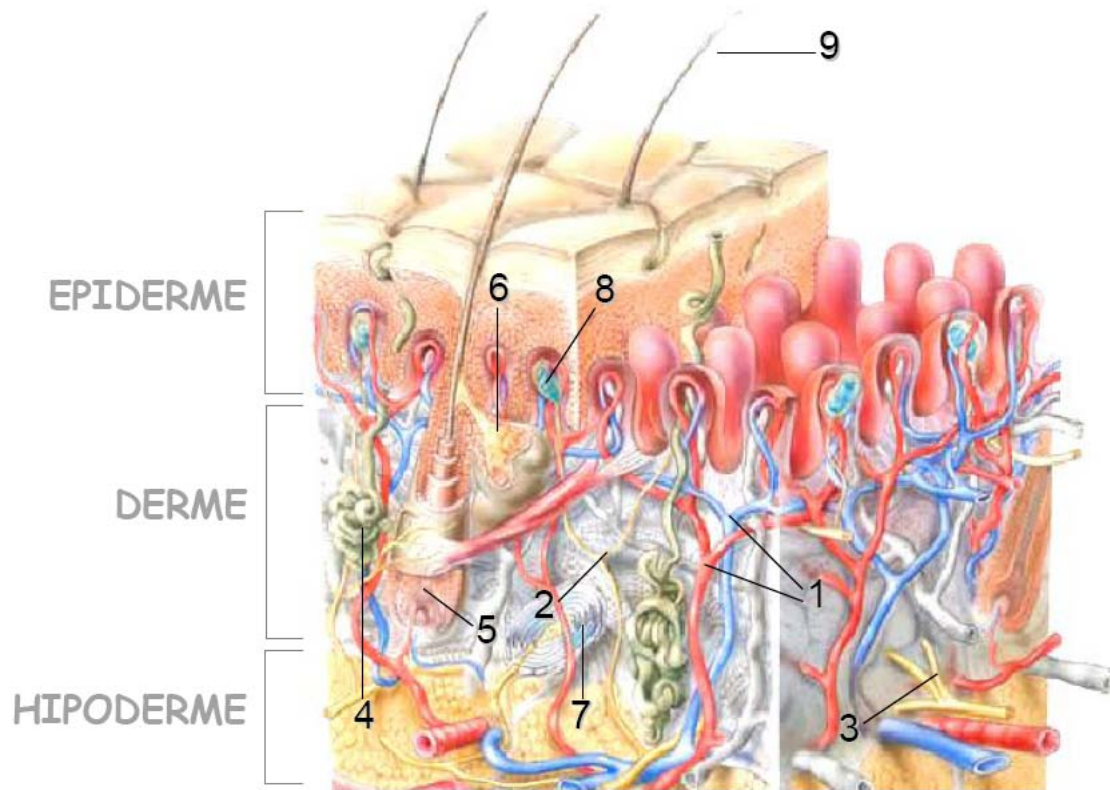
molecular, que desempenham um papel crucial nas reações imunes, inflamatórias e nas infecções virais. A maioria das quimiocinas causa quimioatração de leucócitos, mas essas moléculas também afetam na angiogênese e a produção de colágeno (TINCANI, 2007).

Nos últimos anos o conhecimento sobre as bases moleculares da inflamação tem sido cada vez mais esclarecido, e agora se sabe muito sobre o papel primordial de citocinas inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , uma vez que ambas induzem a produção de outras citocinas inflamatórias e quimiocinas, expressão de moléculas de adesão, angiogênese e são capazes de mediar os efeitos sistêmicos da inflamação, como febre, hipotensão e infiltrado celular (TINCANI, 2007).

## **1.2. Fisiopatologia de doenças Cutâneas**

A pele é um órgão complexo que isola e recobre aproximadamente 2 m<sup>2</sup> da superfície corpórea e representa 15% do peso corporal, sendo constituída por três camadas de estrutura e propriedades distintas: a epiderme, derme e hipoderme (Figura 1), dispostas e inter-relacionadas de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções. A estrutura, as propriedades e a composição da pele variam consideravelmente em relação à idade. A pele e seus derivados epidérmicos desempenham várias funções como: proteção física, química e biológica, impedindo perda de água para o meio, promover as sensações, pressão, tato e variações de temperatura, síntese de hormônios (diidrotestosterona) e vitaminas (vitamina D), promove a regulação térmica, metaboliza xenobióticos e excreção de substâncias através

das glândulas sudoríparas (CHUONG et al., 2002; HAAKE et al., 2000; SAMPAIO et al., 2000; SHAEFER & REDELMEIER, 1996; ROSS et al., 1993).



**Figura 1:** Esquema simplificado de uma secção transversal de pele. 1- vasos sanguíneos, 2-terminações nervosas, 3- vasos linfáticos, 4- glândula sudorípara, 5-raiz do pelo, 6- glândula sebácea, 7-corpúsculo de Vater-Pacini, 8- corpúsculo de Ruffini, 9- pelo. Fonte: Freinkeil e Woodley, 2001.

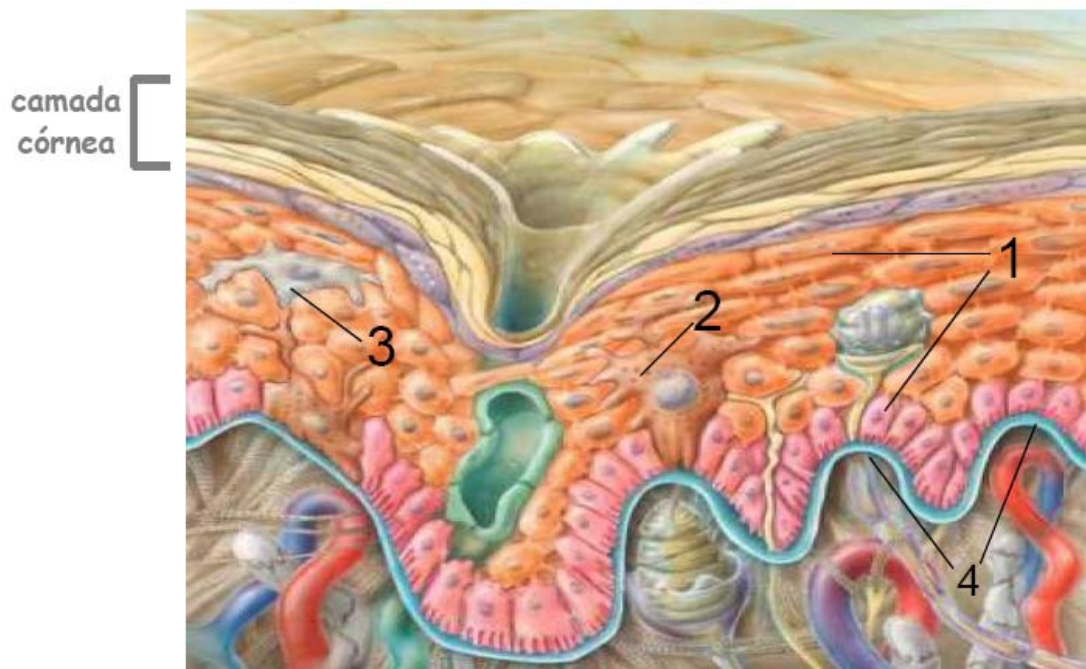
A camada superior da pele é chamada de epiderme, sendo constituída por um epitélio estratificado pavimentoso cuja espessura apresenta variações topográficas ao longo do organismo (CANDI et al., 2005; SAMPAIO et al., 2000). A epiderme é classificada basicamente em quatro camadas (Figura 2), cada uma apresentando uma função distinta (NORRIS, 2004; ROSS et al., 1993):

- 1) Camada córnea – atua como uma grande barreira à penetração de organismos externos e toxinas, prevenindo também a perda de água;
- 2) Estrato granuloso – Camada na qual inicia-se o processo de

cornificação, onde as células sofrem apoptose diferenciando-se em corneócitos;

3) Estrato espinhoso – Formada por queratinócitos que são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina (queratinização) que interagem com os desmossomas, síntese de agentes antioxidantes (glutathione redutase, peroxidase, catalase), citocinas, quimiocinas, etc;

4) Estrato basal - camada mais profunda responsável pela proliferação celular, sendo que, essa camada resiste ao processo apoptótico.



**Figura 2:** Esquema simplificado de uma seção transversal da epiderme. 1- queratinócitos, 2- melanócito, 3- célula de Langerhans, 4- papilas dérmicas. Fonte: Freinkeil e Woodley, 2001.

A epiderme é constituída de múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias. Aproximadamente 80-85% da epiderme é

constituída de queratinócitos, 10-13 % de melanócitos, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Merckel (KOSTER e ROOP, 2004; FREINKEIL e WOODLEY, 2001).

A manutenção do número de células na epiderme depende do balanço entre proliferação e morte celular (diferenciação/apoptose) dos queratinócitos. Esse processo é governado pela comunicação parácrina e autócrina via hormônios, fatores de crescimento e citocinas ou por comunicação intercelular via célula-célula e célula-matrix de adesão, ou ainda pela comunicação intercelular na região da “gap junction” (HAAS e HERLYN, 2005; HAAKE et al., 2000). A epiderme tem a capacidade de auto-renovação tanto sob condições homeostáticas como em condições nocivas, devido à presença de uma população celular mitoticamente ativa na camada basal. Em condições normais, a renovação epidérmica é balanceada pela descamação da camada córnea na superfície da pele, onde se verifica uma diferenciação celular progressiva, através do processo de queratinização e cornificação, a partir da camada basal em direção a superfície (CANDI et al., 2005; FUCHS e RAGHAVAN, 2002).

Os queratinócitos são o principal tipo celular presente na epiderme, sendo responsáveis pela manutenção da integridade da estrutura epidérmica, também estando envolvidos na resposta imunológica do tecido cutâneo, uma vez que expressam diferentes citocinas, quimiocinas e também moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC-II). No processo de diferenciação celular os queratinócitos passam a produzir a queratina, uma proteína resistente e impermeável que preenche as células mais superficiais da



epiderme (queratinócitos) e que promove força mecânica, mantêm a estrutura do queratinócito e contribui na adesão celular (CHAN, 2004).

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

Além das células residentes da epiderme (queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel), outras células migram para a epiderme em resposta aos mais variados estímulos nas quais incluem: os linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, sendo essas células elementos da resposta de defesa inata ou adquirida (RANG et al., 2007; NORRIS, 2004).

A derme consiste num tecido conectivo, cuja espessura é superior ao da epiderme, porém com uma população celular inferior. Esta estrutura confere à pele elasticidade, força tensil e resistência mecânica. Além disso, a derme interage com a epiderme através da junção dermoepidérmica, garantindo assim as trocas de elementos nutritivos e metabólicos entre essas camadas (HAAKE et al., 2000). A derme é dividida em camada papilar, que é a camada mais próxima da epiderme, e a camada reticular, que é formada por um tecido conectivo denso e constitui a maior parte da derme (NORRIS, 2004). A

constituição da derme envolve polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares), receptores sensoriais (ex.: corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos.

Os fibroblastos sintetizam diferentes macromoléculas que entram na constituição da matriz celular como, por exemplo, o colágeno e a elastina (HAAKE et al., 2000; SAMPAIO et al., 2000; ROSS, 1993). Durante um processo inflamatório ocorre o aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos devido à ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (FREINKEL & WOODLEY, 2000).

Os vasos sanguíneos presentes na derme permitem que ocorra a infiltração de células migratórias importantes no processo de resposta de defesa inata ou imune e de cicatrização, como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, entre outros (RYAN, 2004). A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda, prontamente e efetivamente, a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta, extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea (BURBACH et al., 2000; HAAKE et al., 2000; WILLIAMS & KUPPER, 1996).

A pele, além de ser um dos principais locais para a invasão de bactérias, fungos, parasitas e vírus, devido a sua grande exposição também é um

importante local para a indução de tumores, porém todos esses processos são influenciados pela resposta imune adquirida, que inclui células dendríticas especializadas (ex.: células de Langerhans) e linfócitos T auxiliar (Th1 e Th2) (NORRIS, 2004). Nesse contexto, a pele é muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas também uma extensão do sistema imunológico (WILLIAMS e KUPPER, 1996).

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

A dermatite atópica é uma doença inflamatória crônica que tem seu início antes dos cinco anos de idade em 80% dos casos e que pode persistir até a fase adulta. É caracterizada por um estado de hiper-reatividade cutânea a estímulos normalmente inócuos a indivíduos não-atópicos, ressecamento intenso, prurido, eritema, níveis elevados de IgE e eosinofilia. A etiologia da

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

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

A dermatite de contato, por sua vez, é uma dermatose inflamatória freqüente nos países industrializados, sendo uma das doenças ocupacionais mais comuns. É caracterizada por eritema, pápulas e vesículas, seguidas de ressecamento e descamação. De acordo com os mecanismos fisiopatológicos

envolvidos, podem-se distinguir dois tipos de dermatite de contato: a dermatite de contato irritativa, decorrente dos efeitos tóxicos e pró-inflamatórios de xenobióticos capazes de ativar a imunidade inata da pele; e a dermatite de contato alérgica, também conhecida como hipersensibilidade de contato, que requer a ativação da imunidade adquirida antígeno específica, levando ao desenvolvimento de células T efectoras, que são mediadoras da inflamação cutânea (HENNINO et al., 2005).

Várias são as vias envolvidas no processo inflamatório cutâneo, assim existe uma variedade de alvos moleculares que, quando antagonizados ou neutralizados, bloqueiam uma via, conduzindo a um efeito antiinflamatório e/ou imunossupressor (SIMMONS, 2006). Nesse contexto, a compreensão da ação e do uso de fármacos antiinflamatórios e imunossupressores nas doenças inflamatórias cutâneas exigem o conhecimento do tipo de reação inflamatória presente.

A melhor compreensão da reação imunológica cutânea permitiu grandes avanços em relação ao desenvolvimento de novas terapias na última década e aumentou o arsenal de agentes disponíveis para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas tanto na forma de monoterapia quanto na forma de um esquema terapêutico que inclui diferentes agentes utilizados simultaneamente (SKINNER, 2005). Os agentes imunossupressores são utilizados no tratamento de afecções cutâneas que tenham em sua patogênese o envolvimento do sistema imune e exercem seus efeitos via inibição da produção ou ação da IL-2 (ex.: tacrolimus, pimecrolimus, ciclosporina), inibição da expressão de genes de responsável pela produção de citocinas (ex.: glicocorticóides) e inibição da síntese de purinas ou pirimidinas (ex.: micofenolato de mofetila) (RANG et al.,

2007). Os imunomoduladores macrolactâmicos, como o pimecrolimus e o tacrolimus, inibem seletivamente a ativação das células T e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, (IL-3, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$ ). A terapia tópica com esses agentes imunomoduladores já se mostrou efetiva em diversas condições dermatológicas, como na dermatite atópica, dermatite de contato, dermatite seborreica, entre outras (SKINNER, 2005).

Os corticóides restringem a proliferação clonal das células Th através da redução da transcrição gênica para IL-2, porém também interferem na transcrição de outras citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, etc). O micofenolato de mofetila tem sido cada vez mais utilizado no tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes na dermatologia, sendo útil como agente poupador do uso de glicocorticóides em certas condições dermatológicas como distúrbios bolhosos auto-imunes, incluindo o pêfigo vulgar (SIMMONS, 2006).

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

O sistema imune como alvo no tratamento de algumas patologias dermatológicas e a compreensão do mecanismo de ação destes agentes

permite a transição da terapia clássica com os corticóides tópicos, os quais apresentam grandes alterações fisiológicas, para a terapia com agentes imunomoduladores (SKINNER, 2005; NICKOLOFF & NESTLE, 2004). No entanto, os corticóides ainda são os agentes antiinflamatórios mais empregados no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, devido aos seus efeitos sobre a resposta imune e sua ação anti-inflamatória. Porém, o uso contínuo dos corticóides é freqüentemente acompanhado de efeitos adversos severos e muitas vezes irreversíveis, incluindo a atrofia cutânea, telangiectasias, hipertricrose, alterações no processo de cicatrização, Síndrome de Cushing, entre outros (SCHOEPE et al., 2006; SCHÄCKE et al., 2002).

Mesmo com o arsenal de agentes antiinflamatórios e imunossupressores disponíveis, alguns fatores comprometem a adesão do paciente ao tratamento como o esquema posológico, efeitos adversos indesejáveis, custo elevado do tratamento, etc (LEUNG et al. 2004; GOTTLIEB, 2005). Além disso, alguns medicamentos não atingem a eficácia desejada ou comprometem a resposta imunológica, aumentando o risco a infecções (RANG et al., 2007; FOX et al., 2006; DISEPIO et al., 1999). Assim, a busca por novos agentes tem sido amplamente focada nos produtos naturais, em busca de um fármaco efetivo no tratamento das doenças inflamatórias cutâneas.

### **1.3. Produtos naturais como alvos terapêuticos**

As plantas e extratos vegetais foram e continuam sendo uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos e, devido a sua grande diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas, podem ser modelo para a síntese de inúmeros fármacos (NODARI & GUERRA, 2000). A redução da biodiversidade seja pelos desmatamentos para exploração da madeira, expansão de áreas cultivadas ou como consequência do aquecimento global, despertou maior interesse pelas espécies que ora existem, mas que poderão estar extintas dentro de pouco tempo. Isto trouxe a discussão sobre as perdas que estas práticas acarretam e a necessidade de procedimentos que tenham como meta o desenvolvimento sustentável. A indústria de medicamentos percebeu nos produtos naturais uma grande oportunidade de desenvolvimento em vários segmentos da cadeia produtiva, seja na industrialização dos fitoterápicos, na distribuição de matérias-primas, na produção de plantas medicinais, entre outros (FONTE, 2004).

Atualmente, estima-se que 50% do total dos fármacos mundialmente utilizados na clínica são derivados de produtos naturais (GURIB-FAKIM, 2006). Apesar do percentual de crescimento do mercado de fitoterápicos ser bastante significativo, apenas 8% da flora mundial apresenta estudos científicos que comprovam sua utilização, sendo a maioria das indicações ainda baseadas na tradição popular e na observação de efeitos com o relato de alguns casos (NODARI & GUERRA, 2000). Um fator a ser levado em consideração para o incentivo às pesquisas com produtos naturais é a adesão do paciente ao tratamento que é um dos maiores problemas para alcançar o sucesso no



tratamento durante longos períodos. Esta adesão ao tratamento pode ocorrer com o aumento na oferta de produtos naturais/plantas medicinais, possibilitando a reunião de um número maior de simpatizantes, reduzindo significativamente a morbidade/mortalidade, sendo assim o aumento do consumo de drogas naturais é uma atividade comum da população em países em desenvolvimento (CALIXTO, 2000). Sendo assim, o aumento da pesquisa com produtos naturais pode levar ao desenvolvimento de novos produtos.

#### **1.4. *Malva sylvestris***

*Malva sylvestris* é uma espécie da família Malvaceae, natural na Europa, Norte da África e da Ásia. Nos tempos antigos, era usada por gregos e romanos por suas propriedades emolientes e laxantes. Na medicina popular a *M. sylvestris* é amplamente utilizada para diferentes condições inflamatórias (COSTA, 2002; SIMÕES et al., 2004; GUARRERA, 2005).

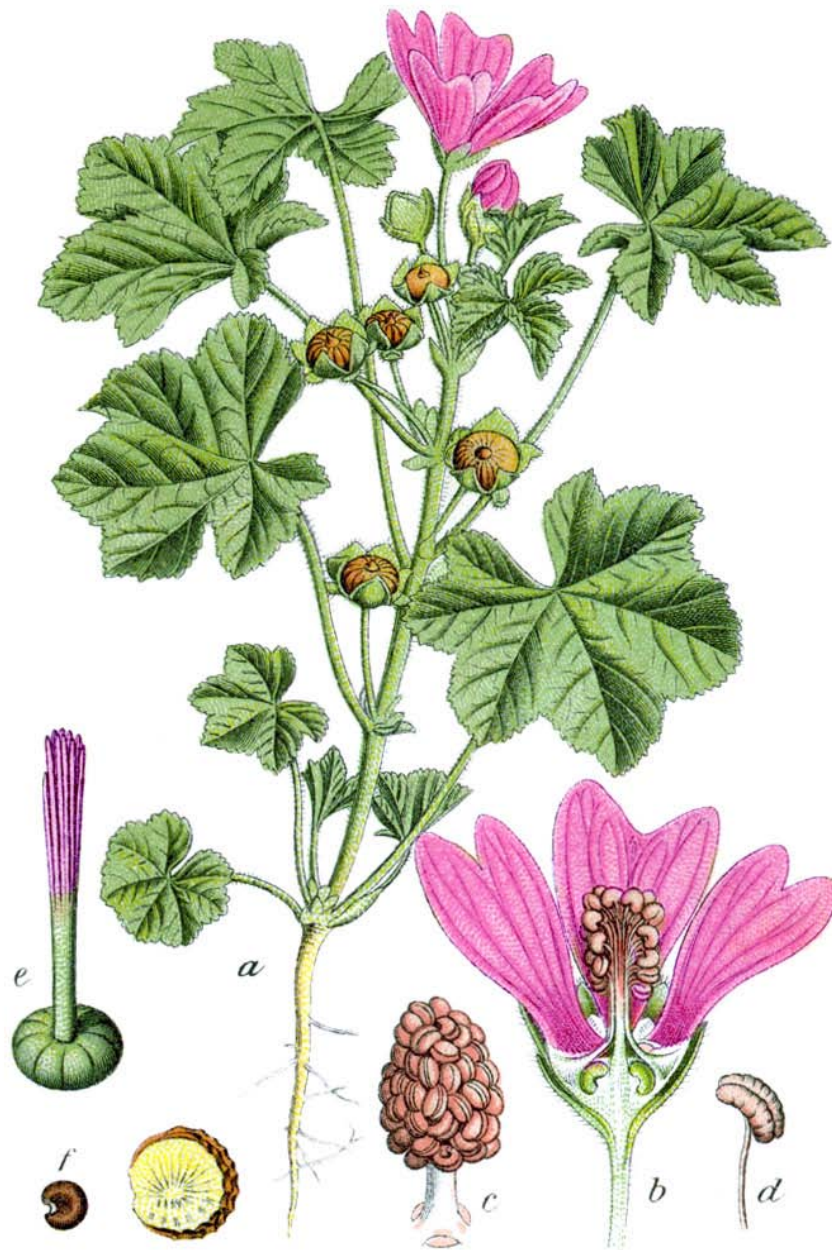
Conhecida popularmente como malva, a *M. sylvestris* é uma herbácea anual, amplamente dispersa, freqüente nos campos, caminhos e entulhos (SIMÕES et al., 2004). Planta ereta, pubescente, com sua raiz principal (figura 4a) perpendicular, grossa, fusiforme, branca, carnuda, e de raízes secundárias fina. O caule é ereto ou ascendente, ramoso, de 60 a 90 cm de altura. As folhas da malva são verdes, moles, macias ao tato, pubescentes, cordiforme-orbiculares, com cinco a sete lóbulos pouco profundos levemente crenados, palminérveas; pecíolo comprido e duas estípulas auxiliares (Figura 3). As flores são pediceladas com numerosos pêlos patentes; epicálice formado por três bractéolas pequenas, lanceoladas, livres; cálice gamossépalo campanulado

(Figura 4b), corola de cinco pétalas livres, maiores que o cálice, cuneiformes, chanfradas, coradas de rosa-violáceo, raiadas de vermelho, prefloração contorcida; estames numerosos (figura 4c e 4d), monodelfos, ligados na base às pétalas e formando tubo por onde emergem os estiletos (Figura 4e) aderentes na base; ovário súpero formado de 10 a 20 carpelos dispostos em círculo, num verticilo em volta do carpóforo e que na maturação originam aquênios (Figura 3 e 4). As folhas e flores são inodoras e possuem sabor mucilaginoso (COSTA, 2002).



**Figura 3:** A esquerda um arbusto de *M. sylvestris* localizado na cidade de Madri no bairro de Peñagrande Espanha contendo folhas e flores. Foto tirada por Luiz Fernández García no dia 30 de abril de 2007. Fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Malva-sylvestris-20070430-2.jpg> e a foto a direita é de uma exsicata online de *M. sylvestris*. Fonte: <http://www.belleuropa.net/cassinazza/fiori/pic02/malva%20sylvestris.jpg> acessado em dezembro de 2009

No exame microscópico da *M. sylvestris* verifica-se a existência de numerosas células de mucilagem em toda a planta, abundantes no parênquima foliar e mais nas sépalas e pétalas. Os pêlos parecem isolados ou em fascículos, divergentes, principalmente sobre as nervuras. Ao lado destes observam-se, ainda nas duas epidermes, pêlos glandulosos, curtamente pedicelados (FARINA et al., 1995).



**Figura 4:** *M. sylvestris* L. ilustrada por Johann Georg Sturm em 1796 e pintada por Jacob Sturm (livro: *Deutschlands Flora in Abbildungen.*) p 883. (a) Raiz principal e secundarias; (b) cálice; (c) estames; (d) estame isolado; (e) estilete; (f) fruto. Fonte: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Malva\\_sylvestris\\_Sturm63.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Malva_sylvestris_Sturm63.jpg)

Dentre seus constituintes, os polissacarídeos, encontrados em concentrações de 5-10%, são semelhantes aos encontrados para as demais espécies da mesma família (Malvaceae). Para as flores é relatada a presença de flavonóides, antocianidinas e leucoantocianidinas. Nas folhas foram detectados flavonóides sulfatados. As mucilagens encontradas nas folhas (8,2%) e nas flores (6,1%) contêm ácido D-galacturônico, D-galactose, glucose, L-arabinose, xilose e L-ramnose. As quantidades destes constituintes nas duas mucilagens são semelhantes. Na planta identificaram-se ainda taninos e vitaminas A, B1, B2, B9 e C, a cor das flores resulta de um antocianósido, o malvósido, além da presença de óleos essenciais (FARINA *et al.*, 1995; SIMÕES *et al.*, 2004; COSTA, 2002, VESHKUROVA *et al.*, 2006). Cutillo e colaboradores (2006) também descreveram a ocorrência de terpenóides como sesquiterpenos, diterpenos e monoterpenos.

Avaliações farmacológicas realizadas especificamente com infusões de malva são raras, baseando-se, principalmente na correlação dos constituintes presentes. Preparações das folhas e flores secas de malva, especialmente na forma de infusos, são empregadas pelas propriedades emolientes, que se devem às mucilagens, na redução e/ou alívio do estímulo do catarro nas vias respiratórias superiores em estados inflamatórios das mucosas e faríngea (FARINA *et al.*, 1995).

Alguns estudos têm descrito a utilização e a eficácia de flores e folhas da *M. sylvestris*. Um ensaio clínico realizado por Guarrera e colaboradores (2005) demonstra o alívio da tosse na utilização do extrato hidroalcoólico. Em modelos animais, o extrato hidroalcoólico de *M. sylvestris* apresentou efeito antinociceptivo (ESTEVES *et al.*, 2009), ação anti – inflamatória quando

realizado edema de pata induzido pela carragenina sendo aplicado topicamente (FRONTERA et al., 2009), e como agente cicatrizante em modelo de queimadura (PIRBALOUTI et al., 2009). Nas doenças inflamatórias que acometem membranas mucosas, o extrato é utilizado como tratamento (SIMÕES et al., 2004) Finalmente, as propriedades antioxidante e sequestradora de radical livre *in vitro* da *M. sylvestris* foram apresentadas por DellaGreca e colaboradores (2009). Já foi relatado que alguns componentes, como escopoletina, presente na *M. sylvestris* são eficazes em modelos de inflamação da pele (MUSCHIETTI et al., 2001; DELLAGRECA et al., 2009).

São raras as avaliações farmacológicas dos extratos da *Malva sylvestris*, principalmente quando comparado o seu uso e de seus constituintes. Com isso, se faz importante avaliar o seu possível efeito antiinflamatório tópico. Tendo em vista a ausência de estudos que comprovem a eficácia e segurança do uso desta planta, somado a falta de eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis para as patologias cutâneas de caráter inflamatório, o estudo sobre a eficácia da *M. sylvestris* mostra-se justificada.

# Objetivos

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do EEMS (EEMS), duas frações e a resina em modelos animais a partir de técnicas farmacológicas e os possíveis mecanismos de ação desta planta.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito do EEMS, duas frações e a resina em modelo de edema de orelha mediado por acetato de 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) e do EEMS quando mediado por ácido araquidônico (AA);
- Avaliar o efeito do extrato EEMS sobre a migração leucocitária;
- Analisar a influência do EEMS nos níveis da citocina IL-1 $\beta$ ;
- Identificar se o EEMS possui atividade em modelos de hipersensibilidade induzido por oxazolona.

# Materiais e Métodos



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

O material vegetal foi adquirido da Quimer Ervas Medicinais – São Paulo. A fim de verificar se realmente era *M. sylvestris* o material adquirido, foi realizado testes de controle de qualidade através exames de morfologia vegetal seguindo padrões da farmacopéia brasileira e helvética, uma vez este material se encontrava rasurado. Estas análises foram realizadas pela Prof. Dra. Marcia Duarte do Dep. Ciências Farmacêuticas - UFPR

O extrato etanólico foi preparado pelo professor Moacir Pizzolatti do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, a partir das folhas secas da *M. sylvestris*.

As folhas de *M. sylvestris* (3 kg) foram submetidas à extração por maceração exaustiva com EtOH/ H<sub>2</sub>O ( EtOH 96%), a temperatura ambiente, durante uma semana. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor sob pressão reduzida, a 50 °C, até 1/3 de seu volume inicial. O extrato etanólico foi mantido em repouso por alguns dias a 4 °C. Logo após, notou-se o aparecimento de um resíduo sólido, diante este fato, foi realizada uma filtração para separar este resíduo sólido do restante do extrato, onde se obteve um rendimento de 157,6 g de extrato e 43 g de resíduo O protocolo de extração foi adaptado de CUTILLO e colaboradores (2006).

### **3.2 Animais**

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* (25-35 g) provenientes e mantidos no Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, em temperatura de  $22 \pm 2$  °C, respeitando uma fase clara/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração. Antes do início dos experimentos os animais foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 1 hora para adaptação, não sendo estes animais reutilizados em testes posteriores. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios. O presente projeto foi submetido à avaliação do comitê de ética em experimentação animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob o número 399.

### **3.3 Avaliação do edema de orelha**

O modelo animal *in vivo* mais utilizado para estudar o processo inflamatório cutâneo é a indução de edema na orelha de camundongos. Este modelo consiste num método rápido e simples, requer pouca quantidade de substâncias e permite resultados reprodutíveis. No que diz respeito à sua aplicação farmacológica, este modelo induzido por diferentes agentes (ex.: TPA, radiação UVB, ácido araquidônico e oxazolona) permitem uma variedade de modelos de inflamação cutânea apropriados para a avaliação tanto tópica como sistêmica de agentes sintéticos, extratos de plantas, bem como

substâncias isoladas de plantas (GÁBOR, 2000; WINYARD & WILLOUGHBY, 2003).

Este modelo foi empregado com o objetivo de verificar inicialmente a formação de edema e posteriormente a análise de outros parâmetros do processo inflamatório com coleta de amostras (círculos de 6 mm de diâmetro da orelha de camundongo) após a eutanásia dos animais. O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos em  $\mu\text{m}$ . A espessura foi medida antes e após a indução do processo inflamatório utilizando um micrômetro digital (Great MT-04513). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e registrando a sua espessura através da diferença entre a primeira medida (basal) e a medida feita após a aplicação do agente flogístico. Para minimizar variações de medida na técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador. O extrato etanólico, as diferentes frações e os agentes flogísticos foram dissolvidos em 20  $\mu\text{L}$  de acetona e aplicados na orelha direita de camundongos de forma tópica.

### **3.4 Edema de orelha induzido pela aplicação de TPA**

Um dos constituintes ativos do óleo de cróton é o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). A aplicação tópica de ésteres de forbol, como o TPA, induz inflamação na pele e respostas hiperproliferativas (quando aplicado de forma crônica) nos animais, assemelhando-se sob muitos aspectos aos sinais de algumas doenças de pele como a psoríase (GÁBOR, 2000). O edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5  $\mu\text{g}$ ) na orelha direita de

camundongos sobre um volume de 20  $\mu$ l. O extrato etanólico, as frações (aquosa, acetato e resina) da *M. sylvestris* e a dexametasona (utilizada como controle positivo) foram aplicados topicamente seguindo o mesmo procedimento logo após a aplicação do TPA. A variação da espessura da orelha foi avaliada 6 horas após a aplicação do agente flogístico (TPA) (DE YOUNG *et al.*, 1989). Foram coletadas amostras das orelhas dos camundongos 6 horas após a aplicação do TPA, para a dosagem de citocina, e 24 horas após a indução do edema, para realização da avaliação histológica e da atividade da enzima mieloperoxidase.

### **3.5 Atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)**

A atividade da enzima MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando metodologia de Bradley e colaboradores (1982) modificada por De Young e colaboradores (1989). Foram adicionados às amostras 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 mL do tampão HTBA e centrifugado a 12000  $\times$ g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 30  $\mu$ L do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente foram adicionados 200  $\mu$ L de uma mistura contendo 100  $\mu$ L de uma solução de fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, 85  $\mu$ L da solução de fosfato de sódio 0,22 M pH 5,4 e 15  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,017% em cada poço. O início da reação ocorre pela adição de 20  $\mu$ L de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida 8%. Posteriormente a

placa foi incubada a 37°C por 3 min e a reação interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate Reader EL 808) com comprimento de onda de 630 nm, sendo expressa em mDO/biópsia.

### **3.6 Quantificação dos níveis de IL-1β tecidual**

O nível tecidual de IL-1β foi avaliado 6 h após a aplicação do TPA nas orelhas de camundongos utilizando o método de ELISA como descrito previamente por Otuki et al. (2005) com pequenas modificações. As amostras (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram homogeneizadas em um tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de fluoreto de feniltimetilsulfonil (PMSF), 0,1 mM cloreto de benzametônio, 10 mM de EDTA e 20 µM de aprotinina e centrifugadas a 3000 xg por 10 min. O sobrenadante foi coletado e mantido a -80° C para análise posterior. Os níveis de IL-1β foram avaliados utilizando kit de ELISA (R&D System, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

### **3.7. Análise histológica**

Foram realizados estudos histológicos a fim de avaliar a modificação estrutural e também celular da pele causada pelo TPA e alteração após tratamento com a *M. sylvestris*. As amostras de orelhas, coletadas dos

camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por TPA, foram fixadas em solução de Alfac (85% álcool 80° GL, 10% formaldeído 40% e 5% ácido acético) por 16 h. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm e coradas 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 utilizando aumento de 200 e/ou 400 x, sendo fotografadas para avaliação histopatológica.

### **3.8 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico**

O ácido araquidônico, assim como seus metabólitos, estão envolvidos na patogênese de várias doenças inflamatórias da pele, como verificada na dermatite atópica e psoríase (GÁBOR, 2000). Desta forma, o extrato e as frações da *M. sylvestris* foram administrados topicamente após a aplicação do ácido araquidônico (2,0 mg/orelha) na orelha direita de camundongos. A variação da espessura da orelha foi avaliada 1 hora após a aplicação do agente flogístico (YOUNG et al., 1984; CRUMMEY et al., 1987).

### **3.9 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica da oxazolona**

Para verificar o efeito da *M. sylvestris* sobre a resposta inflamatória alérgica utilizamos o modelo de hipersensibilidade tardia induzido por oxazolona. A dermatite de contato alérgica é definida como uma reação de

hipersensibilidade do tipo tardia, que envolve duas fases: a fase de sensibilização ou indução e a fase efetora (BAS et al., 2007). Este modelo se assemelha com as dermatites observadas em humanos, na qual se verifica a formação do edema, migração de leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T (CD4+ e CD8+) (BAS et al., 2007; FUJI et al., 2002). Os animais foram sensibilizados através da aplicação tópica de 50  $\mu$ L de uma solução de oxazolona a 2% (p/v) em acetona, no abdômen dos animais por 2 dias consecutivos. Os animais foram tricotomizados 48 horas antes. Após 6 dias da sensibilização o desafio foi realizado, onde foi aplicado topicamente 30  $\mu$ L da solução de oxazolona a 2% 15  $\mu$ L em cada face da orelha direita dos animais, sendo que o extrato hidroalcolólico da *M. sylvestris* na dose de 3 mg/orelha foi administrado com 1 hora de antecedência da aplicação da oxazolona, assim como a dexametasona que foi utilizada como controle positivo. A administração por via tópica do extrato prosseguiu nos tempos de 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após o desafio, sendo o edema avaliado a cada 24 horas no decorrer desse período (RECIO et al., 2000).

### **3.10 Análise Estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das DI50 (dose necessária para inibir em 50% as respostas inflamatórias dos grupos tratados em relação ao grupo controle), que foram representados como a média geométrica seguido de seu respectivo intervalo de confiança, de 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de

Newman – Keuls quando necessário. Valores de P menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados significativos. Os cálculos acima foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* version 3.00, San Diego Califórnia, EUA.



# Resultados

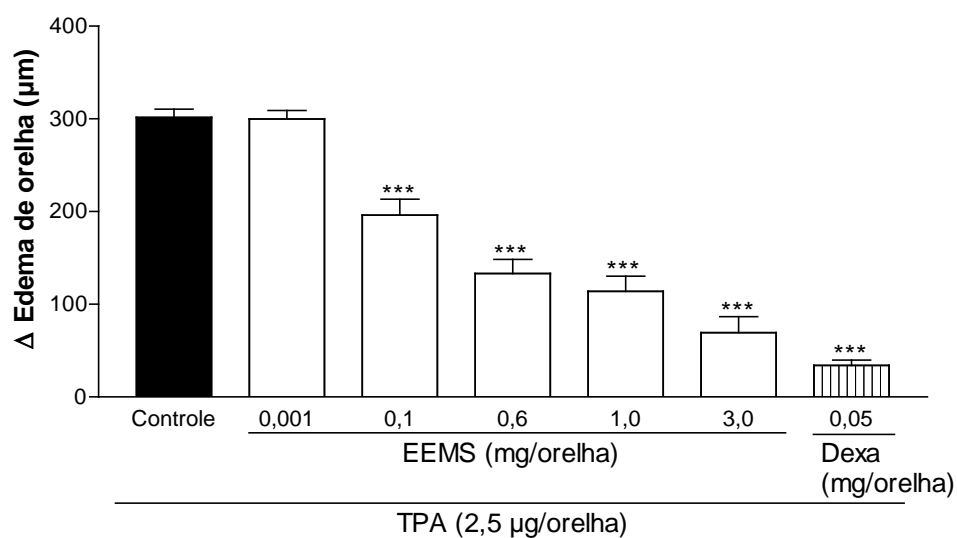
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)

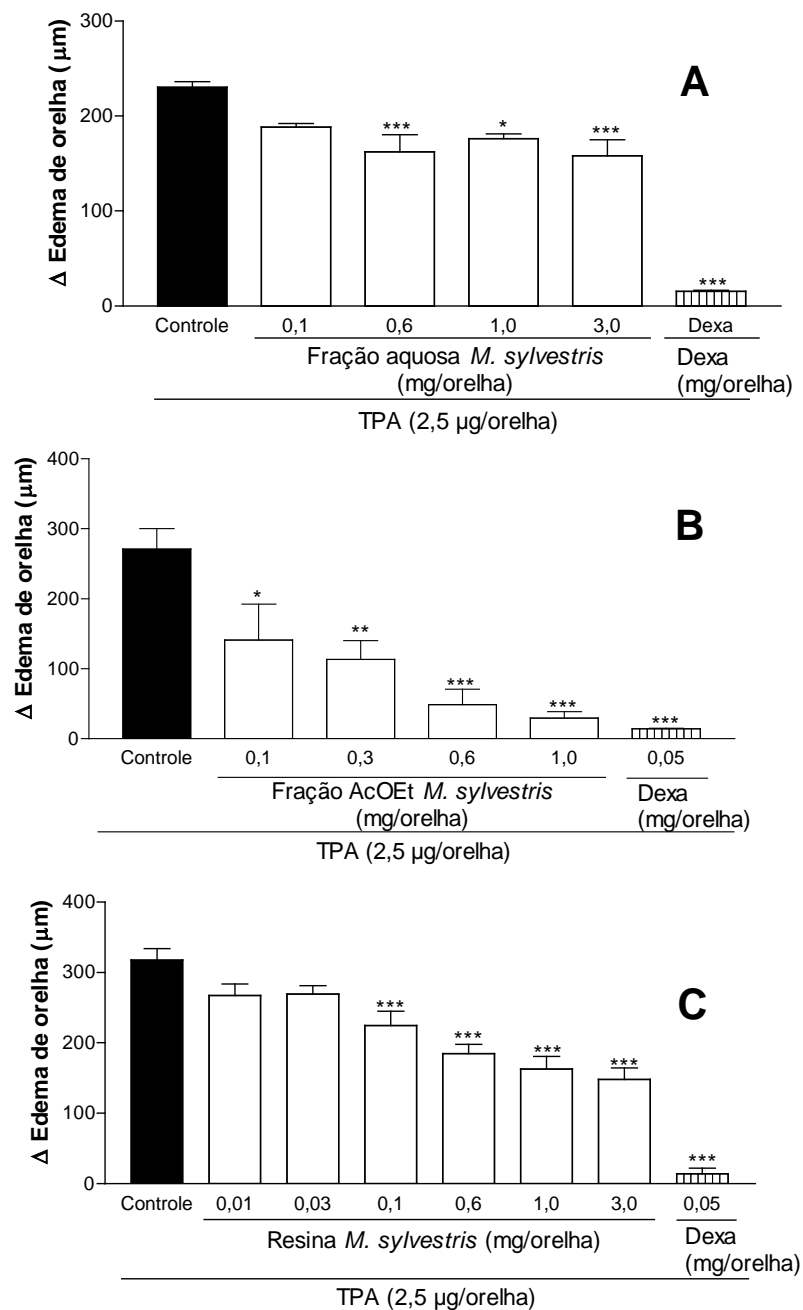
Aplicação tópica do EEMS (Figura 4) causou uma inibição significativa e dose-dependente do edema de orelha causado pelo TPA. O valor DI50 do EEMS foi de 0,36 (0,12 - 0,90) mg/orelha, com inibição de  $77 \pm 6\%$  na dose de 3,0 mg/orelha.

A aplicação tópica da fração aquosa da *M. sylvestris* foi capaz de prevenir a formação do edema em  $31,4 \pm 7,4\%$ , em relação ao controle, na dose de 3,0 mg/orelha (Figura 6A). A fração acetato de etila (Figura 6B) também foi capaz de impedir a formação do edema causado pelo TPA, na dose de 1,0 mg/orelha com inibição de  $89,2 \pm 3,4\%$  em relação ao controle. A resina da *M. sylvestris* (Figura 6C) na maior dose (3,0 mg/orelha) causou inibição significativa do edema de orelha de  $53,3 \pm 5,1\%$ .

O fármaco utilizado como referência, a dexametasona (0,05 mg/orelha), provocou significativa inibição do edema induzido pelo TPA em todos os testes, apresentando efeito inibitório de  $89 \pm 2\%$ ,  $93,4 \pm 0,6\%$ ,  $94,8 \pm 0,4\%$  e  $95,5 \pm 2,5\%$ , respectivamente nas figuras 6A, 6B e 6C.



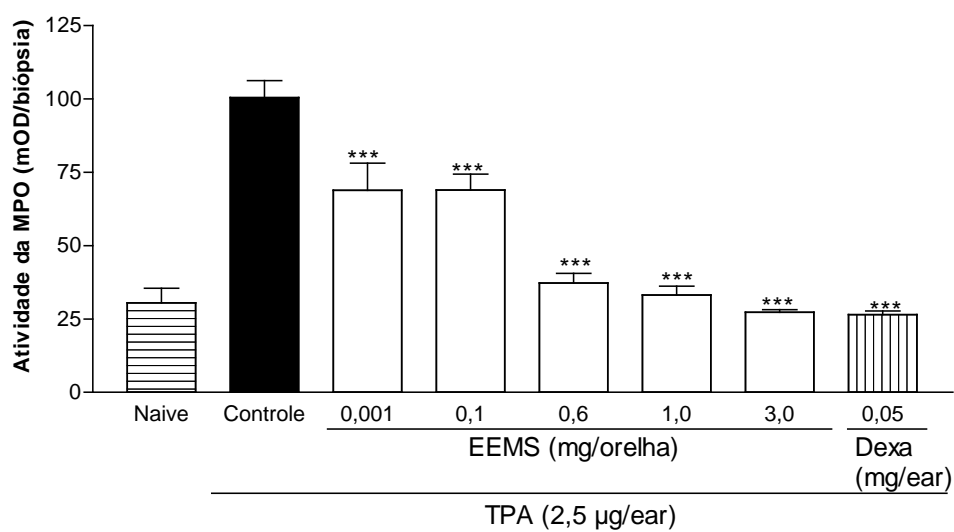
**Figura 5:** Efeito do EEMS e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA. O edema foi avaliado 6 h após a indução. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média com um N de 5-10 animais. Os asteriscos representam a diferença dos grupos em relação ao controle, sendo que  $***P < 0,001$  de significância.



**Figura 6:** Efeito de diferentes frações e resina da *M. sylvestris* e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA. O edema foi avaliado 6h após a indução, Onde **A** é o efeito da fração aquosa, **B** fração acetato de etila e **C** a resina do extrato de *M. sylvestris*. Cada ponto representa a media  $\pm$  erro padrão da média com um N de 5 - 9 animais. Os asteriscos representam a diferença significativa dos grupos em relação ao controle, sendo que, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .

## 4.2 Ensaio da atividade da MPO

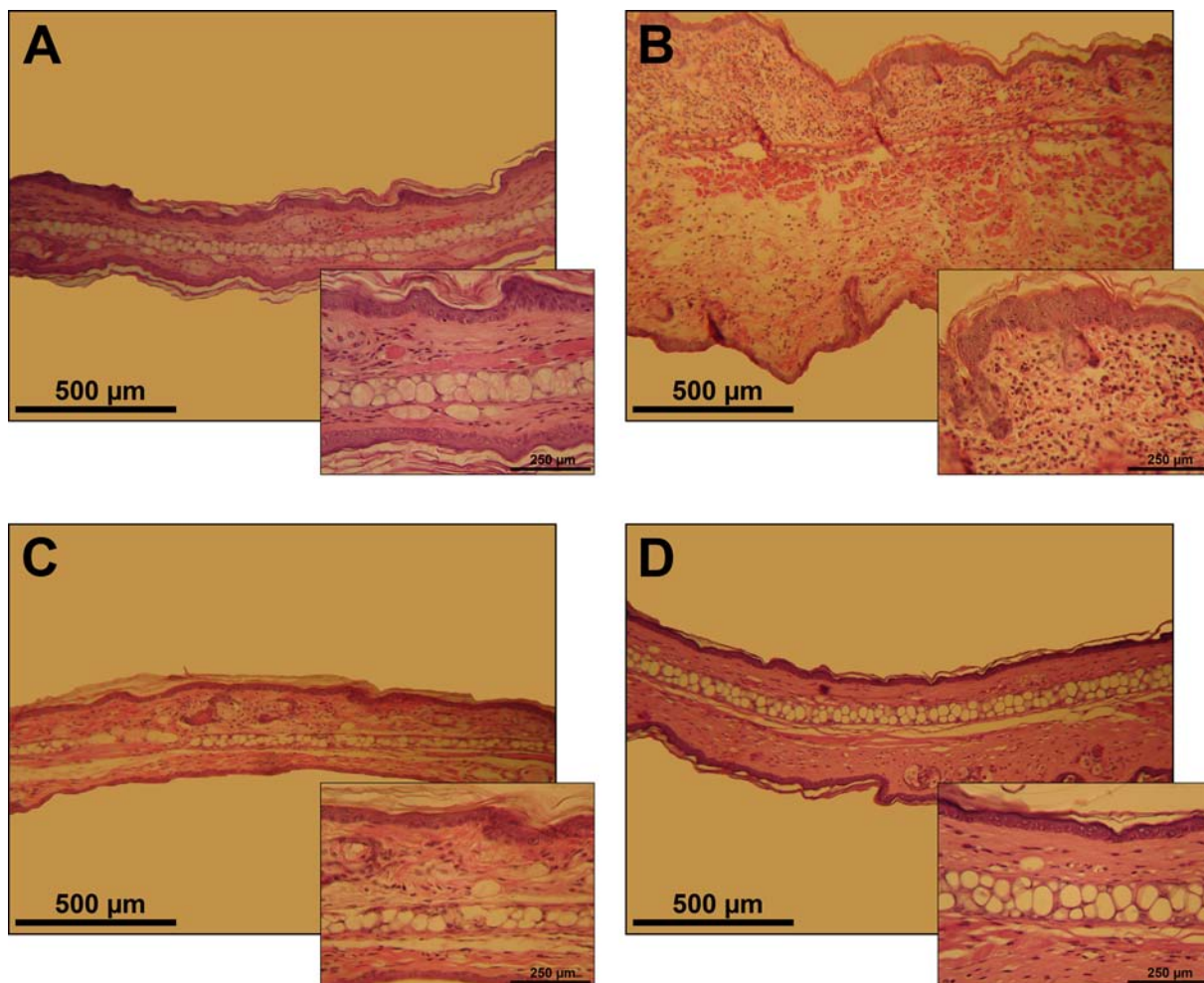
O tratamento da orelhas com TPA induziu aumento significativo na atividade da MPO no local (Figura 7). Aplicação do EEMS foi capaz de inibir o aumento da atividade da MPO causado pelo TPA de modo dependente da dose. O valor DI50 foi de 0,46 (0,30-0,62) mg/orelha e a maior inibição da atividade enzimática foi na dose de 3 mg/orelha impedindo por completo a migração. A droga usada como referência dexametasona (0,05 mg/orelha) também causou uma inibição total para a atividade MPO.



**Figura 7:** Efeito do EEMS e dexametasona (Dexta) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA. A atividade da MPO foi avaliada 24h após a indução do edema. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média com um N de 5 - 8 animais. Os asteriscos representam a diferença dos grupos em relação ao controle, sendo que \*\*\* $P < 0,001$  de significância.

### **4.3 Analise histológica**

A análise por microscópica óptica das orelhas 24 h após a aplicação de TPA, revelou o aparecimento de infiltração de células inflamatórias, associadas com os vasos sanguíneos dilatados. Todos os eventos foram reduzidos após a aplicação tópica de 3,0 mg/orelha do EEMS bem como pela aplicação de 0,05 mg/orelha do controle positivo, dexametasona (Figura 8).

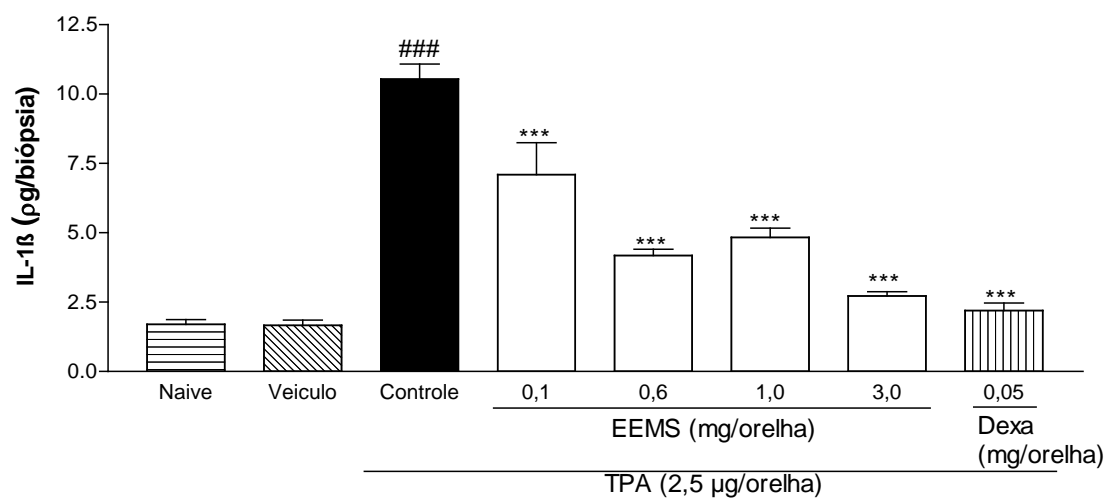


**Figura 7:** Efeito do EEMS e dexametasona administrado topicamente após a indução do edema de orelha por TPA. Os cortes histológicos foram feitos 24 h após a indução do edema. Sendo que (A) veiculo, (B) TPA, (C) TPA + *M. sylvestris*, (D) TPA + Dexa. Coradas com hematoxilina e eosina e secções de 5 μm em um aumento de 200X e 400X.



#### **4.4 Quantificação dos níveis de IL-1 $\beta$ tecidual**

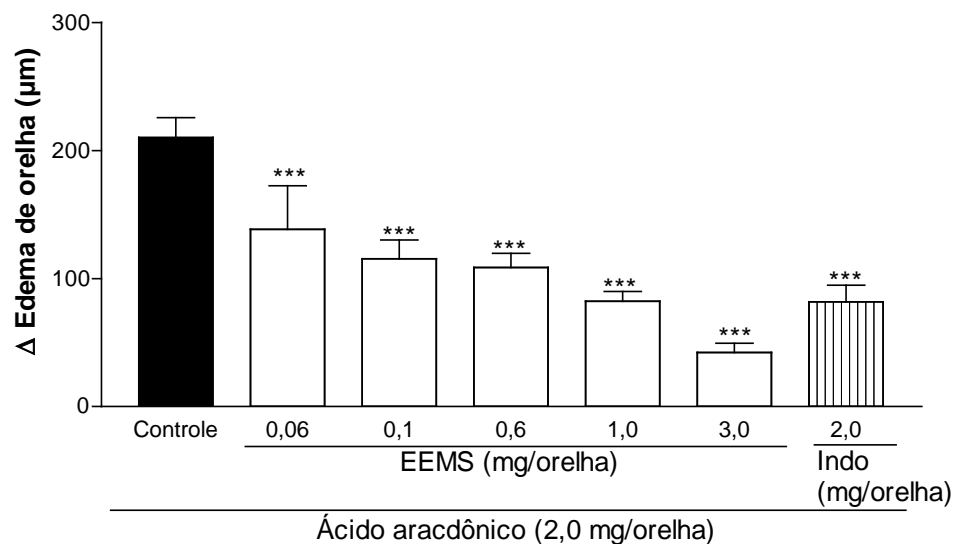
A aplicação tópica de TPA na orelha causou aumento significativo no nível de IL-1 $\beta$  no tecido após o tratamento com TPA (Figura 9). O aumento no nível de IL-1 $\beta$  na orelha foi inibido de modo dependente da dose pela aplicação tópica do EEMS, apresentando valor de DI50 de 0,96 (0,92 - 1,0) mg/orelha e uma inibição completa com a dose de 3,0 mg/orelha. O tratamento com dexametasona (0,05 mg/orelha) também causou redução completa do aumento no nível de IL-1 $\beta$  provocado pelo TPA (Figura 9).



**Figura 8:** Efeito do EEMS e dexametasona (Dexta) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA na produção de IL-1 $\beta$ . O nível de IL-1 $\beta$  foi avaliado 6 h após a aplicação do TPA. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média com um N de 4 - 5 animais. Os asteriscos representam a diferença dos grupos em relação ao controle, sendo que \*\*\* $P < 0,001$  de significância.

#### **4.5 Indução de edema de orelha por ácido araquidônico**

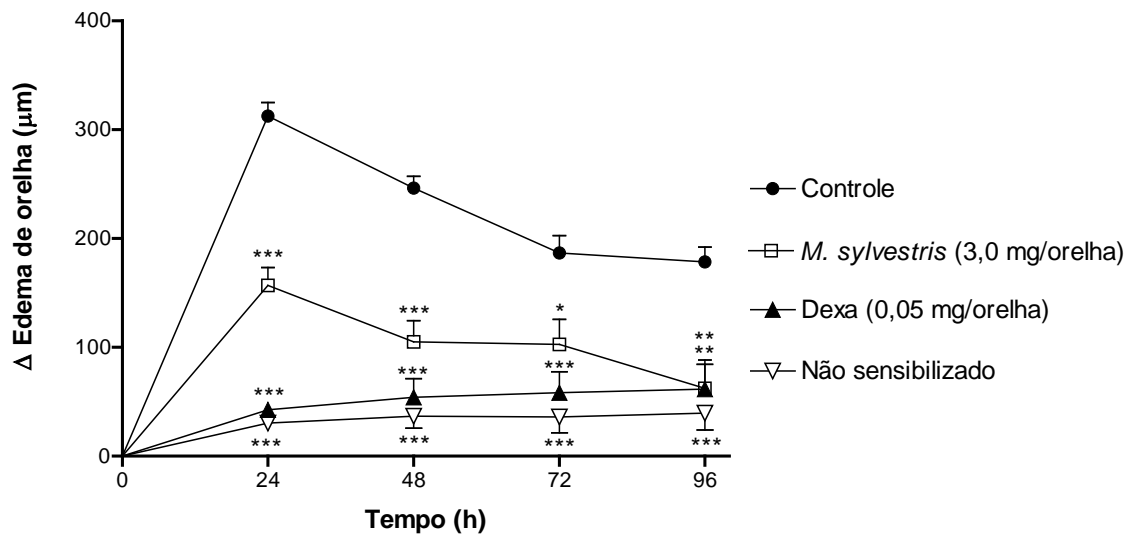
Os metabolitos derivados da ciclooxigenase e da lipoxigenase pela via do ácido araquidônico (AA) estão envolvidos no processo inflamatório. A aplicação tópica de AA provoca resposta inflamatória rápida e intensa na orelha de camundongos, que é bloqueada por seus respectivos inibidores (Young et al., 1984; De Young et al., 1989). A aplicação tópica do EEMS causou inibição significativa e dose-dependente do edema de orelha induzido por AA. O valor de DI50 para o extrato foi de 0,39 (0,37-0,42) mg/orelha, com inibição de  $80 \pm 3\%$  na dose de 3,0 mg/orelha. Neste modelo foi utilizada como droga de referência a indometacina (2,0 mg/orelha), que também causou uma inibição significativa do edema causado pelo AA em  $62 \pm 6\%$  (Figura 10).



**Figura 10:** Efeito do EEMS e Indometacina (Indo) administrado topicamente na indução do edema de orelha por AA. O edema foi avaliado 1h após a indução com AA. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média com um N de 5 - 8 animais. Os asteriscos representam a diferença dos grupos em relação ao controle, sendo que \*\*\* $P < 0,001$  de significância.

#### **4.6 Indução de edema de orelha por oxazolona**

O desafio com oxazolona na orelha promoveu a formação de edema, que perdurou por até 96 h nos animais previamente sensibilizados. Entretanto, esse efeito não foi observado nos animais que não foram expostos a oxazolona na fase de sensibilização (Não sensibilizado). O tratamento tópico com o EEMS causou redução significativa já nas primeiras 24 horas após a aplicação (3,0 mg/orelha), apresentando inibição de  $49,8 \pm 5,3\%$ . Transcorrida 96 h do desafio, verificou – se que o tratamento com o extrato da malva apresentou redução do edema de  $65,1 \pm 14,5\%$ , e a dexametasona (0,05 mg/orelha), sendo utilizado como controle positivo do modelo, também causou inibição significativa de  $65,5 \pm 12,6\%$  (Figura 11).



**Figura 11:** Efeito do EEMS e dexametaxona (Dexa) no modelo de hipersensibilidade tardia induzido pela oxazolona. Os animais foram sensibilizados e após 6 dias foram desafiados com uma nova exposição de oxazolona. Para o desafio os animais receberam na orelha solução de oxazolona a 2% (15  $\mu$ L em cada face), e depois de 1 h foram tratados de forma tópica, somente com o veículo (acetona) e esse grupo é denominado de controle, EEMS (3,0 mg/orelha) ou Dexa (0,05 mg/orelha) na fase de sensibilização e fase efetora. Outro grupo de animais, que não foram previamente sensibilizados, foi tratado somente com oxazolona na orelha direita (não sensibilizados). Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média, com um N de 5-10 animais. Os asteriscos representam a diferença significativa dos grupos em relação ao controle, sendo que, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .

# Discussão

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível verificar a ação tópica do EEMS em modelos de inflamação aguda na pele de camundongos. De acordo com Guarrera (2005) a *M. sylvestris* é uma planta amplamente utilizada na medicina popular como agente antiinflamatório. Além disso, o autor demonstrou que o extrato hidroalcoólico das folhas e flores da malva apresenta eficácia no alívio da tosse através de ensaios clínicos (GUARRERA, 2005). Estudo mais recente mostrou que o extrato hidroalcoólico apresenta efeito antinociceptivo em modelos animais (ESTEVES et al., 2009). A escopoletina, composto presente nesta planta, possui atividade antiinflamatória em modelo de inflamação aguda em pele de camundongo induzido por TPA (MUSCHIETTI et al., 2001; DELLAGRECA et al., 2009), sendo então uma das justificativas dos resultados observados.

A reação inflamatória aguda é caracterizada por quatro sinais clássicos, rubor, calor, edema e dor, conhecidos também como sinais cardinais da inflamação descritos pela primeira vez por Cornelius Celsus um século antes de Cristo, e posteriormente foi acrescentado por Galeno o quinto sinal, a perda da função do órgão acometido (RATHER, 1971). A inflamação é composta por vários eventos, como alteração hemodinâmica local, representando o calor e o rubor, o aumento da permeabilidade vascular dando origem a formação do edema, além de um grande aumento no número de leucócitos no local e liberação de diversos mediadores a fim de promoverem uma resolução do processo (RAO et al., 1993; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).



O protocolo experimental de inflamação cutânea e também dos agentes flogísticos como o TPA, AA e a sensibilização promovida pela oxazolona, são amplamente aceitos e utilizados na investigação de fármacos antiinflamatórios esteróides e agentes não esteróides, com efeitos tópicos promovendo eventos característicos como edema, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, os quais com um pico de migração no período de 24 horas, produção de metabólitos do ácido araquidônico, citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (GÁBOR, 2000; OTUKI et al., 2005), por isso a escolha destes modelos.

A aplicação tópica de TPA ocasiona a uma resposta inflamatória, que é avaliada através da formação de edema, aumento da permeabilidade vascular e hiperproliferação epidérmica (FURSTENBERGER et al., 1994), que ocorrem em consequência da produção de mediadores como prostaglandina E<sub>2</sub>, leucotrienos e IL-1. O TPA inicia uma rápida liberação de mediadores como histamina, serotonina e TNF- $\alpha$ , que irão promover o aumento na permeabilidade vascular e grande influxo de neutrófilos, consequentemente provoca a liberação de AA resultando em um metabolismo subsequente da liberação destes mediadores, onde inibidores da fosfolipase A2 fazem com que ocorra uma redução da formação do edema e infiltração de leucócitos neste modelo (BRALLEY, et al., 2007).

Os dados obtidos com o extrato etanólico das folhas de *M. sylvestris* foi capaz de reduzir a formação do edema causado pelo TPA, atingindo inibição de 77% na dose máxima testada (3 mg/orelha), ou seja apresentando eficácia semelhante à droga padrão, a dexametasona. Esse resultado sugere que o

extrato testado da malva possui atividade anti-edematogênica quando aplicado topicamente.

Outro parâmetro avaliado na resposta inflamatória aguda causada pelo TPA foi o efeito da malva sobre a migração leucocitária. Para tanto, o primeiro passo foi verificar o efeito do tratamento tópico com o EEMS sobre o aumento da atividade da enzima MPO na pele. A atividade desta enzima é um indicativo da quantidade de leucócitos PMN infiltrado no tecido (AJUEBOR et al., 2000; BRADLEY et al., 1982). A ativação de neutrófilos aumenta a liberação de leucotrienos e prostanóides na pele os quais promovem um quadro inflamatório. Sendo assim, a redução na migração de neutrófilos impede a síntese destes mediadores inflamatórios, o que pode ser interessante para tratar doenças inflamatórias (TRAMPOSCH et al., 1990). O acúmulo de neutrófilos desempenha um papel crítico em doenças inflamatórias cutâneas, como dermatite (IAROVINSKII et al., 1995). A *M. sylvestris* foi capaz de reduzir a atividade da MPO na pele da orelha de modo dependente da dose. Logo, este resultado sugere que o EEMS é capaz de interferir na migração de PMN no processo inflamatório agudo causado pelo TPA. Para complementar estes dados foi realizada a análise histológica. Esta confirmou que a aplicação tópica do extrato reduziu o influxo de PMN e a formação de edema após a aplicação do TPA.

A aplicação de TPA na pele, além de promover a hiperplasia epidérmica, diferenciação anormal de queratinócitos, infiltração de leucócitos, causa um aumento na produção e liberação de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) (REYNOLDS et al., 1998). Estas citocinas são produzidas tanto por células residentes como por leucócitos que migram após o estímulo inflamatório. Após sua liberação tem

ação local ou sistêmica, o que pode induzir a sua própria produção ou mesmo a geração secundária de outras citocinas. Além disso, tem sido amplamente mostrado que destas ações ocorre a ativação de fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B e AP1) e proteínas quinases (MAPK e da PKC), que, por sua vez, regulam a expressão de genes alvo indispensáveis para a manutenção do estado inflamatório (CALIXTO et al., 2004), sugerindo que ambas as citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) inflamatórias medeiam a sinalização e desempenham um papel crucial na inflamação aguda induzida pelo TPA, sendo a PKC seu principal alvo molecular (GARG et al. 2008; OTUKI et al., 2005; UEDA et al., 2004).

Nossos resultados indicam que o EEMS também foi capaz de reduzir os níveis da citocina IL-1 $\beta$ . De fato, a IL-1 $\beta$  é liberada por células da pele lesada, tais como células dendríticas, células de Langerhans epidérmicas, melanócitos, fibroblastos e leucócitos no sítio inflamatório (GRONE, 2002). Além disso, a IL-1 $\beta$  induz a transcrição de uma série de genes, incluindo moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas secundárias, óxido nítrico sintase e ciclooxigenase, todos relevantes para a inflamação da pele (MURPHY et al., 2000).

A regulação dos genes responsáveis pela expressão de várias proteínas inflamatórias, como citocinas (IL-1 e TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (IL-8 e MIP-1  $\beta$ ), moléculas de adesão (ICAM, VCAM e E-selectina), enzimas (iNOS e COX-2), entre outros, está diretamente ligado ao fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (KARIN & BEN-NERIAH, 2000; PICKART, 2004; ROTHWARF & KARIN, 1999). Diversos estímulos podem induzir a ativação de fatores de transcrição nucleares, tais como NF- $\kappa$ B, incluindo, infecção viral e UV. O aumento da ativação do fator nuclear está diretamente ligado ao agravamento e desenvolvimento de doenças inflamatórias na pele, incluindo psoríase,

dermatite de contato, doenças auto-imunes e carcinogênese (BELL et al., 2003). Sendo assim, é possível que o efeito antiinflamatório da malva seja decorrente, pelo menos em parte, à interferência na produção de IL-1 $\beta$ , o que resultaria na redução dos níveis de outros mediadores e conseqüentemente interferindo negativamente na migração de neutrófilos.

Quando foram testadas as frações acetato de etila, aquosa e a resina no modelo do TPA verificou-se que a fração acetato de etila apresentou maior eficácia com efeito máximo semelhante ao obtido com o extrato. Estes dados corroboram com o observado por DellaGreca e colaboradores (2009) onde demonstraram que a fração acetato de etila é composta por uma grande concentração de escopoletina, composto este com eficácia antiinflamatória comprovada anteriormente (MUSCHIETTI et al., 2001).

Vários trabalhos demonstram que a aplicação tópica de AA provoca uma resposta inflamatória rápida e intensa em orelha de camundongos através da produção de prostaglandinas e leucotrienos, sendo este efeito bloqueado por inibidores da lipoxigenase (LOX) (DE YOUNG et al., 1989; CHANG et al., 1986; CARLSON et al., 1985; Young et al., 1984). Segundo Maldve e colaboradores (2000), o início da resposta inflamatória provocada pelos metabólitos gerados pela ciclooxigenase (COX) e LOX indica uma importante participação dos metabólitos do AA na inflamação aguda. Uma vez que o EEMS foi capaz de prevenir o edema causado pelo AA na pele, sugerindo que um dos mecanismos pelo qual o extrato está tendo seu efeito antiinflamatório pode ser decorrente da interferência na produção de derivados da COX e LOX.

Além do modelo animal de dermatite de contato irritativa (modelo do TPA) investigamos a ação do EEMS em um modelo de dermatite alérgica. A

dermatite de contato alérgica pode ser induzida por alérgenos tais como a oxazolona e o dinitrofluorobenzeno (DNFB), utilizados como ferramentas farmacológicas experimentais. O modelo de edema de orelha induzido pela oxazolona mimetiza a reação de hipersensibilidade de contato do tipo tardia que é caracterizada por uma resposta inflamatória, acompanhada de infiltrado celular e liberação de diversas citocinas (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Duas fases distintas são necessárias para atingir uma reação de hipersensibilidade máxima neste modelo: a fase de sensibilização e a fase efetora. A fase de sensibilização ocorre no primeiro contato da pele com a oxazolona e é a fase responsável pela expansão das células T. A oxazolona aplicada topicamente penetra na epiderme onde é captada pelas células apresentadoras de antígenos (APC), que migram para os linfonodos, onde através do MHC, apresentam as moléculas de oxazolona aos precursores de células T específicas. Estes precursores são ativados e sofrem expansão, sob influência da IL-12 (HENNINO et al., 2005; TUCKERMANN et al, 2007).

A fase efetora ocorre após o contato subsequente com a oxazolona, que induz a produção de quimiocinas, ativação de células endoteliais e de mastócitos, que resultam na ativação da microvasculatura, permitindo a infiltração dos leucócitos durante as primeiras 2 horas. Os linfócitos T sensibilizados migram para a derme e são re-estimulados pelas células de langerhans residentes, onde passam a secretar mediadores inflamatórios que promovem migração leucocitária (TUCKERMANN et al, 2007; HENNINO et al., 2005).

Algumas citocinas secretadas pelos linfócitos T ativados tais como a IL-2, TNF- $\beta$  e IFN $\gamma$  promovem a ativação dos macrófagos e estes, por sua vez,

estimulam a inflamação aguda por meio da secreção de outras citocinas, principalmente TNF- $\alpha$  e IL- 1, quimiocinas, PGs e LTs (ABBAS & LICHTMAN, 2005; DEBENEDICTS et al., 2001). Assim, a sensibilização dos camundongos com a aplicação de oxazolona produz uma hipersensibilização de contato caracterizada por edema, infiltração de monócitos, granulócitos e macrófagos, e aumento da população de linfócitos T (CD8 +) (SHIN, 2005; FUJII et al., 2002; WANG et al., 2000).

A aplicação do EEMS em ambas as fases no modelo da oxazolona reduziu o edema causado pelo desafio. Este efeito da malva utilizada topicamente mostrou eficácia semelhante ao corticóide dexametasona, 72 e 96 h após o desafio. Estes dados mostram que o EEMS também pode interferir na reação inflamatória alérgica da pele.

Estudos que antecedem a este demonstraram que a *M. sylvestris* apresenta classes de compostos com importantes atividades farmacológicas antiinflamatória, tais como terpenos, sesquiterpenos, taninos, flavonóides e polissacarídeos (NIJVELDT et al., 2001). Em outras plantas, como *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita*, *Eugenia brasiliensis*, *Malva parviflora* os mesmos grupamentos químicos se mostram eficazes (PIETROVSKI et al. 2008; SHALE et al., 2005). Recentemente, DellaGreca e colaboradores (2009) descreveram as propriedades antioxidantes e seqüestradora de radicais livres do extrato aquoso de *M. sylvestris* e onze compostos purificados a partir da fração acetato de etila. O trabalho apresentado por Chung e colaboradores (2001) relata que a formação do edema induzido por TPA também pode ser regulada pela geração de peróxido de hidrogênio. Este estudo faz evidência a diversos compostos antioxidantes reduzindo a inflamação produzida pelo TPA. Sendo assim, é

possível que esta atividade sobre ROS possa fazer parte da ação antiinflamatória do extrato testado. Além disso, também confirma a maior potência no efeito anti-edematogênico da fração acetato quando comparada com a fração aquosa e a resina.

# Conclusões



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a administração tópica do EEMS:

- Foi capaz de reverter o edema de orelha e a migração leucocitária, bem como os níveis de IL-1 $\beta$  tecidual mediados por TPA;
- Inibiu o edema de orelha mediado por ácido araquidônico;
- Apresentou eficácia contra o edema em modelo alérgico de pele causado pela oxazolona;
- As frações, principalmente a acetato, mantiveram a eficácia tópica sobre o edema causado pelo TPA.

Este estudo nos permitiu demonstrar que o extrato da *M. sylvestris*, bem como suas frações e resina, apresentam atividade antiinflamatória quando aplicados por via tópica em modelos de inflamação na pele. A avaliação preliminar do mecanismo de ação do extrato sugere interferência na citocina IL-1 $\beta$ , porém outras metodologias devem ser conduzidas para investigar o mecanismo celular e molecular pelo qual a planta exerce este efeito. Além disso, há necessidade da avaliação por testes toxicológicos, a fim de verificar a sua segurança para o uso clínico, justificando seu uso etnofarmacológico.

# **Referências bibliográficas**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

AJUEBOR, M.N.; SINGH, A. AND WALLACE, J.L Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. **American of the Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 279, p 238-244, 2000.

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

BELL, S.; DEGITZ, K.; QUIRLING, M.; JILG, N.; PAGE, S.; BRAND, K. Involvement of NFkappaB signalling in skin physiology and disease. **Cell Signal**, v. 15, p.1-7, 2003.

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

BRALLEY, E.E.; HARGROVE, J.L.; GREENSPAN, P. AND HARTLE, D.K. Topical anti-inflammatory activities of Vitis rotundifolia (muscadine grape)

extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **Journal Medical Food**, v. 10, p. 636-642, 2007.

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

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

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

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. **Nature Review Molecular Cellular Biology**, v.6, p.328-340, 2005.

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

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

CHUNG, W.Y., JUNG, Y.J., SURH, Y.J., LEE, S.S. AND PARK, K.K. Antioxidative and antitumor promoting effects of [6]-paradol and its homologs. **Mutation Research**, v. 496, p. 199-206, 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.; THESTRUPPEDERSON, K.; BERNARD, B.A.; SCHRODER, J.M.; DOTTO, P.; CHANG, C.M. ; WILLIAMS, M.L.; FEINGOLD, K.R.; KING, L.E.; KLIGMAN, A.M., REES, J.L.; CHRISTOPHERS, E. What is the "true" function of skin? **Experimental Dermatology**, v. 11, p. 159-187, 2002.

COSTA, A. F. Farmacognosia, Fundação Caloust Gulbekian, **Manuais Universitários**, v. 2, Lisboa, 2002.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing

topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

CUTILLO, F., D'ABROSCA, B., DELLAGRECA, M., FIORENTINO, A. ZARRELLI, A. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 481-485, 2006.

DE YOUNG, L.M., KHEIFETS, J.B., BALLARON, S.J. AND YOUNG, J.M. Oedema 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.

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

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

DELLAGRECA, M., CUTILLO, F., D'ABROSCA, B., FIORENTINO, A., PACIFICO, S., ZARRELLI, A. Antioxidante and Radical Scavenging Properties of *Malva sylvestris*. **Natural Product Communication**, v. 4, p. 893-896, 2009.

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

ESTEVES, P.F., SATO, A., ESEQUIBEL, M.A., CAMPOS-BUZZI, F., MEIRA, A.V., CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive Activity of *Malva sylvestris* L.. **Latino American Journal Pharmacology.**, v. 28 (3), p. 454-456, 2009.

FARINA, A.; DOLDO, A., COTICHINI, V., RAJEVIC, M., QUAGLIA, M. G., MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F. HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva sylvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 203-211, 1995.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 4<sup>th</sup> ed. São Paulo, **Atheneu**. 2000.

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

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

FONTE, N.N. A Complexidade das Plantas Medicinais: Enfoque Farmacêutico. In: CORREIA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCEFFER, M.C. **Complexo**

**Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectivas.** 1.ed. Curitiba: EMATER, p. 24 - 45, 2004.

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

FREINKEIL, R.K.; WOODLEY, D.T. Introduction. FREINKEIL, R.K.; WOODLEY, D.T. In: **The Biology of the Skin.** 1 ed. New York :The Parthenon Publishing Group, p.15-17, 2001.

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

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

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

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



GARG, R., RAMCHANDANI, A.G, MARU, G.B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 1249-57, 2008.

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

GOTTLIEB, A.B. Psoriasis: emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 4, p. 19-34, 2005.

GRONE, A. Keratinocytes and cytokines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 1-12, 2002.

GUARRERA, P. M. Tradicional phytotherapy in Central Italy. **Fitoterapia**, v. 76, p. 1-25, 2005.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27 pg. 1–93 ,2006 .

GUTTMAN-YASSKY, E.; LOWES, M.A.; FUENTES-DUCULAN, J.; WHYNOT, J.; NOVITSKAYA, I; CARDINALE, I.; HAIDER, A.; KHATCHERIAN, A.; CARUCCI, J.A.; BERGMAN, R.; KRUEGER, J.G. Major differences in

inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 119 (5), p.1210-1217, 2007.

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

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

IAROVINSKII, B.G., ZUROCHKA, A.V., EBERT, L., SHTIVEL'BAND, M.I. AND POPOV, G.K. Status of the regulatory function of neutrophils in patients with atopic dermatitis. **Biulleten' Eksperimental' noi Biologii i Meditsiny**, v. 120, p. 318-319, 1995.

KARIN, M., BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa] B activity. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 621-663, 2000.

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

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

LEUNG, D. Y. M., JAIN, N., LEO, H. L. New concepts in the pathogenesis of atopic dermatitis. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, p. 634-638, 2003.

LEUNG, D. Y. M., SOTER, N. A. Cellular immunologic mechanisms in atopic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, p. S1-12, 2001.

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

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

MALDVE, R. E., KIM, Y., MUGA, S. J., FISCHER, S. M. Prostaglandin E2 regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin. **Journal of Lipid Research**, v. 41, p. 873-881, 2000.

MURPHY, J.E., ROBERT, C., KUPPER, T.S. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. **Journal Investigative Dermatology**, v. 114, p. 602-608, 2000.

MUSCHIETTI, L., GORZALCZANY, S., FERRARO, G., ACEVEDO, C. AND MARTINO, V. Phenolic compounds with anti-inflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. **Planta Medica**, v. 67, p. 743-744, 2001.

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

NIJVELDT, R.J., VAN NOOD, E., VAN HOORN, D.E., BOELENS, P.G., VAN NORREN, K. AND VAN LEEUWEN, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NODARI, R.O; GUERRA, M.P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: SIMÕES, M.O, et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2a Edição. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000

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

OTUKI, M. F., VIEIRA-LIMA, F., MALHEIROS, A., YUNES, R., CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and  $\alpha$ -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.

PHARMACOPOEIA HELVETICA, 7<sup>th</sup> ed. Berne, **Département Fédéral de L'Intérieur**. 1993.

PICKART, C.M. Back to the future with ubiquitin. **Cell**, v. 116, p. 181-190, 2004.

PIETROVSKI, E. F., MAGINA, M. D., GOMIG, F., PIETROVSKI, C. F., BARCELLOS, M., PIZZOLATTI, M. G., CABRINI, D. A., BRIGHENTE, I. M., OTUKI, M. F. Topical activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60(4), p. 79-87, 2008.

PIRBALOUTI, A.G., YOUSEFI, M., NAZARI, H., KARIMI, I., KOOHPAYEH, A. Evaluation of burn healing properties of *Arnebia euchroma* and *Malva sylvestris*. **Electronic Journal of Biology**, v. 5, p. 62-66, 2009.

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

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

RATHER LJ. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 47(3), p.303-22, 1971.

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

REYNOLDS, N.J., VOORHEES, J.J. AND FISHER, G.J. Cyclosporin A inhibits 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced cutaneous inflammation in severe combined immunodeficient mice that lack functional lymphocytes. **The British Journal of Dermatology**, v. 139, p. 16-22, 1998.

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

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

ROTHWARF, D.M., KARIN, M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment.**, v 5, p. 1, 1999.

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

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

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

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

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

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

SHALE, T.L., STIRK, W.A. AND VAN STADEN, J. Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 325-330, 2005.

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

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

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao**



**medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2004.

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

TINCANI, A., ANDREOLI, L., BAZZANI, C., BOSISO, D., SOZZANI, S. Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p. 1–7, 2007.

TRAMPOSCH, K. M., ZUSI, F. C., MARATHE, S.A., STANLEY, P; L., NAIR, X, STEINER S.A., QUIGLEY, J. W. Biochemical and pharmacological properties of a new topical compound, 9-phenylnonanohydroxamic acid (BMV 30094). **Inflammation Research**, v. 30, p. 9578, 1990.

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

UEDA, H., YAMAZAKI, C., YAMAZAKI, M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor

necrosis factor-alpha production. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, p. 119–125, 2004.

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

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

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

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

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