

1- INTRODUÇÃO

1.1. *Pele: estrutura e função*

A pele recobre a superfície de aproximadamente 2 m² do corpo, sendo o maior órgão do corpo humano e a principal barreira física contra o meio externo. Embora a pele desempenhe diversas funções vitais de comunicação e controle que garantem a homeostase do organismo, por muitos anos este órgão foi considerado apenas uma barreira contra agentes externos. Estas funções foram resultados da evolução de uma estrutura complexa que envolve diversas camadas, cada uma com propriedades particulares. As principais camadas da pele incluem a epiderme, derme e a hipoderme (Figura 1) (WILLIAMS e KUPPER, 1996; CHUONG et al., 2002).

A camada de superfície (epiderme) é formada por células epiteliais estratificadas que está sobre a camada do tecido conectivo (derme). Por sua vez a epiderme e a derme estão fixadas em uma camada composta por tecido adiposo: a hipoderme (KOSTER e ROOP, 2004; KUPPER e FUHLBRIGGE, 2004).

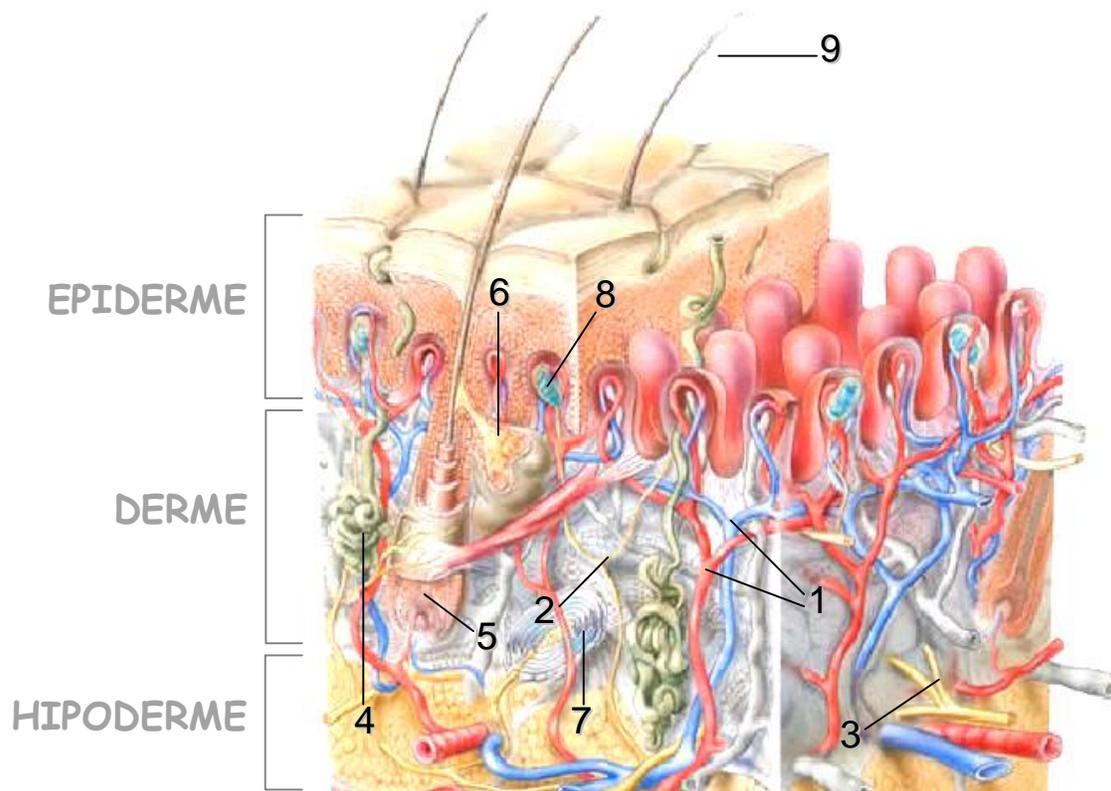


Figura 1. Esquema simplificado de uma seção transversal de pele. 1- vasos sanguíneos, 2-terminações nervosas, 3- vasos linfáticos, 4- glândula sudorípara, 5-raiz do pelo, 6- glândula sebácea, 7-corpúsculo de Vater-Pacini, 8- corpúsculo de Ruffini, 9- pelo. Fonte: Freinkeil e Woodley, 2001.

Aproximadamente 80% da epiderme é constituída de queratinócitos que são as células responsáveis pela formação do epitélio estratificado pavimentoso. Estas células possuem este nome devido a sua função essencial, que é a fabricação de queratina, uma proteína que preenche as células mais superficiais da epiderme para formar a camada córnea. Um tipo de célula dendrítica chamada melanócito, que representa 13% da população celular da epiderme, se distribui por toda a extensão da epiderme e através de seus dendritos, distribui a melanina que produz para os queratinócitos ao seu redor. Outra população de células presente na epiderme são as células de Langerhans.

Estas células, presentes igualmente na boca, pulmão, bexiga, reto e vagina, capturam antígenos que romperam a camada córnea da epiderme e migram para derme onde apresentam antígenos para linfócitos T, induzindo assim uma resposta imune (KOSTER e ROOP, 2004; KRUEGER e BOWCOCK, 2004) (Figura 2).

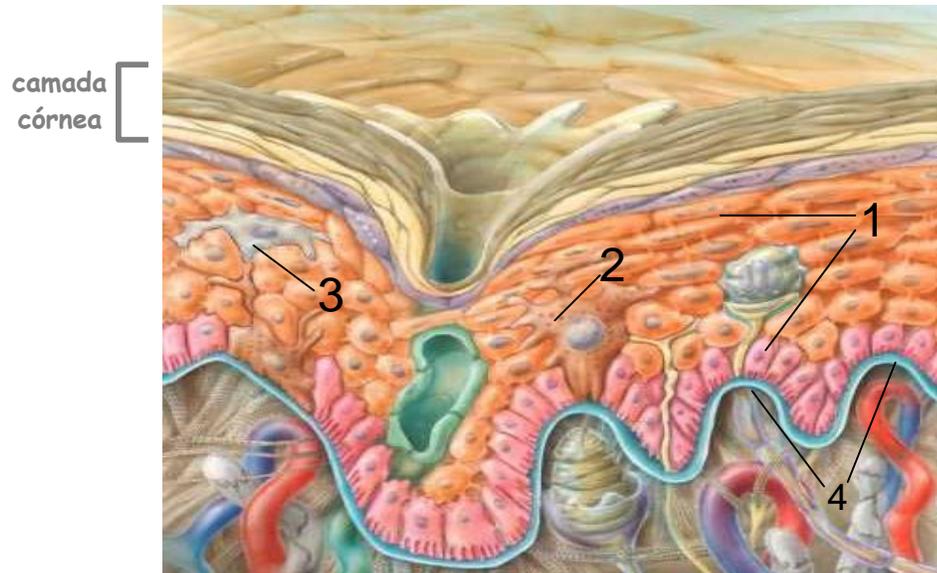


Figura 2. Esquema simplificado de uma secção transversal da epiderme. 1- queratinócitos, 2-melanócito, 3- célula de Langerhans, 4- papilas dérmicas. Fonte: Freinkeil e Woodley, 2001.

O formato ondulado da camada da epiderme mais próxima à derme aumenta a superfície de contato entre estas duas, favorecendo assim trocas de elementos nutritivos e metabólicos. A interface entre estas duas camadas da pele é denominada junção dermoepidérmica. A derme é um tecido conjuntivo constituído por uma grande variedade de tipos celulares e por uma abundante matriz extracelular. Esta matriz é formada por células residentes da derme conhecidas como fibroblasto, as quais sintetizam diferentes macromoléculas que

entram na constituição da matriz extracelular (STADELMANN et al., 1998; ECKES e KRIEG, 2004; DHOVAILLY et al., 2004).

Na derme, estão as artérias, veias sanguíneas e vasos linfáticos. As artérias e seus ramos menores, as arteríolas, provenientes do ventrículo esquerdo pela aorta, veiculam o sangue rico em oxigênio e nutrientes. Vênulas e veias asseguram o retorno dos resíduos provenientes do metabolismo celular e em partículas do dióxido de carbono. Através destes vasos a derme recebe outros tipos celulares conhecidos como células migratórias: macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos entre outras. Estas células desempenham um importante papel em eventos como infecção de microorganismos, inflamação e na cicatrização (WILKES e KUPPER, 1996; RYAN, 2004; WELSS, 2004).

A derme também conta com um sistema de inervação sensitiva e vegetativa. Nervos vegetativos inervam glândulas sudoríparas, músculo piloerector e vasos sanguíneos e auxiliam no controle da temperatura corporal. As inervações sensitivas da derme composta por receptores periféricos conduzem estímulos mecânicos, térmicos, químicos e dolorosos para o sistema nervoso central (GAULE e FRY, 2003; GOODWIN e WHEAT, 2004).

A barreira física gerada pela pele não só protege os órgãos internos e limita a passagem de substâncias, mas também estabiliza a temperatura e pressão sanguínea através de seus sistemas de circulação e evaporação. A pele é capaz de sintetizar hormônios (ex. dehidrotestosterona) e vitaminas (ex. vitamina D) assim como metabolizar xenobióticos (CHUONG et al., 2002). A pele também é responsável por sensações de toque, dor, calor e frio (através de suas

terminações nervosas livres e encapsuladas como os corpúsculos de Vater-Pacini e Ruffini); expressa cor em situações de raiva, ansiedade, medo, além de servir como diferenciação pessoal por sua variação individual de cor, odor e textura (BARRY, 1983; GOODWIN e WHEAT, 2004).

1.2. Patologias cutâneas

Devido a grande extensão e contato com o meio ambiente e seus agentes agressores, a pele e seus anexos apresentam várias disfunções. Conforme o tipo de agente agressor, a pele pode sofrer uma lesão física como cortes, queimaduras por radiação ultravioleta, lesão química como queimadura por solventes orgânicos ou infecção por microorganismos como vírus (*Herpes* sp.) ou fungos (*Candida* sp.). As disfunções também podem ser classificadas de acordo com o local que acometem a pele, como a psoríase e ictiose (disfunção na epiderme), dermatite herpetiformis (disfunção na junção derme-epiderme), urticária e quelóide (disfunção na derme) (SOTER, 1981; MILLIKAN et al., 1992; API, 2002; FAERGEMANN, 2002; ROWSE e EMMETT, 2004).

Muitas destas lesões e disfunções apresentam em seu decorrer um processo inflamatório. A inflamação representa uma complexa mobilização dos sistemas de defesa celular e humoral do organismo, com participação vascular, neural e hormonal, desencadeada por estímulos físicos, químicos ou biológicos. A sua finalidade é tentar circunscrever a alteração ao local de sua incidência e evitar a sua disseminação a outras regiões do organismo (BECKER, 1997; KUSHNER, 1998).

1.3. Processo inflamatório cutâneo

O processo inflamatório na pele é produzido e mantido pela interação de vários tipos celulares residentes como as terminações nervosas, queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais e macrófagos, além de células que migram para o tecido inflamado como neutrófilos, eosinófilos, monócitos, e linfócitos (NICKLOFF e NESTLE, 2004). A interação destes tipos celulares é modulada por substâncias conhecidas como mediadores inflamatórios.

Desta forma, vários mediadores pró-inflamatórios solúveis são liberados, incluindo os neuropeptídeos (substância P, CGRP etc), metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas etc), monoaminas (histamina, serotonina etc) e citocinas (interleucinas, interferons etc). Estes mediadores por sua vez, através da estimulação de seus respectivos receptores, produzem diversos segundos mensageiros que ativam múltiplas vias de sinalização, incluindo proteínas quinases (PK) como a PKC, PKA e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). As proteínas quinases por sua vez podem desencadear respostas que modificam a expressão de proteínas da célula em questão. Para tal, ocorre a ativação de fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear- κ B e o AP-1 (proteína ativadora-1), os quais são responsáveis pela transcrição de diversas proteínas (citocinas, enzimas etc), e dessa forma funcionam modulando, mantendo e amplificando a resposta inflamatória (BUCKLE e HEDGECOCK, 1997; PUIGNERO e QUERALT, 1997; BHAGWAT et al., 1999).

1.4. Patologias inflamatórias cutâneas

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

A falha de algum destes mecanismos reguladores pode fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, perca o controle e desregule a homeostase do órgão, predispondo o mesmo a desenvolver um processo inflamatório crônico. Uma resposta inflamatória excessiva significa uma manifestação clínica que necessita de uma intervenção terapêutica (BUCKLE e HEDGECOCK, 1997; ROBERT e KUPPER, 1999; DEBENEDICTIS et al., 2001).

Existe um grande número de patologias caracterizadas por um processo inflamatório ou com um componente imunológico (Tabela 1). Assim, mesmo pertencendo ao mesmo grupo de patologias (inflamatórias) os sintomas e os mecanismos envolvidos com sua patogênese são muito diferentes. Desta forma, existem patologias iniciadas por um processo alérgico ou irritativo que podem transcorrer por curto ou longo prazo, denominadas agudas e crônicas, respectivamente. Ou seja, pesquisar doenças inflamatórias cutâneas não

necessariamente significa estudar patologias com mesmo perfil e mesmo tipo de tratamento.

Tabela 1. Exemplos de patologias cutâneas com envolvimento de inflamação.

Patologia	Característica
Dermatite atópica	patologia inflamatória crônica associada a uma hiperreatividade causada por alérgenos inócuos a indivíduos não atópicos
Dermatite de contato	dermatose alérgica causada por um agente externo posto em contato com a pele (ex. níquel)
Dermatite por irritação	processo inflamatório causado por um agente agressor (ex. ácidos)
Psoríase	processo inflamatório crônico com lesões erimatoescamosas causadas por um distúrbio hiperproliferativo de queratinócitos
Pênfigo	formação de bolhas na epiderme em associação a auto-anticorpos dirigidos contra constituintes da superfície de queratinócitos
Vitiligo	despigmentação da pele causada por um processo auto-imune, onde linfócitos T atacam melanócitos

Fonte: Poyner, 2000.

As doenças inflamatórias da pele têm grande incidência na população, algumas destas patologias como a psoríase acometem 3% da população mundial. Entretanto, os medicamentos atualmente disponíveis na prática médica, como antiinflamatórios não esteroidais, anti-histamínicos, glicocorticóides e imunossupressores, estão muito longe de tratar com eficácia processos inflamatórios cutâneos crônicos como a psoríase e a dermatite atópica. Estes medicamentos possuem baixa eficácia e na maioria das vezes são inefetivos: cerca de 79% dos tratamentos para estas patologias falham na primeira opção de tratamento. Além disso, existe baixa aderência ao tratamento devido a pouca aceitação dos medicamentos devido às características físicas (cosméticas), seus efeitos adversos e a necessidade de uso contínuo dos mesmos. Os estudos clínicos realizados com pacientes portadores de psoríase demonstraram que cerca de 40% dos pacientes interromperam o tratamento antes de seu término (DISEPIO et al., 1999; BITO et al., 2002).

Outro ponto importante a ser considerado na prioridade de desenvolvimento de novos medicamentos para este tipo de patologias é o fato de que aproximadamente 30% dos produtos da medicina tradicional são usados para o tratamento de patologias relacionadas com a pele e, paradoxalmente, apenas 3% dos novos fármacos desenvolvidos atualmente destinam-se ao tratamento destas doenças. Motivo pelo qual, a academia e a indústria farmacêutica vêm estudando novas alternativas para o tratamento das

patologias que acometem a pele, bem como novos alvos terapêuticos e novas entidades químicas (GRAHAM-BROWN, 2000; CAUWENBERGH, 2002).

Enzimas como proteínas quinases, ciclooxigenases, fosfolipases e outras proteínas como citocinas e receptores de membrana são consideradas alvos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos e têm gerado grande interesse para descoberta de uma nova geração de antiinflamatórios para tratamento de patologias como a artrite, asma, esclerose múltipla e psoríase (BHAGWAT et al., 1999).

Mesmo após a evolução no conhecimento da patofisiologia de diversas doenças e o surgimento de novas estratégias de desenvolvimento de fármacos, vários medicamentos utilizados como antiinflamatórios para patologias cutâneas atuam sem um alvo terapêutico definido. Cada vez mais o desenvolvimento de fármacos busca uma molécula com maior eficácia e menos efeitos adversos (NESTLE e NICKOLOFF, 2004).

Um exemplo é o desenvolvimento de moléculas e anticorpos com afinidade por receptores de linfócitos T para o tratamento da psoríase. O Daclizumab (Zenapax[®]; Protein Design Labs), um anticorpo humanizado, se liga à subunidade de alta afinidade do receptor da interleucina-2 (CD 25) que está envolvido com a proliferação e ativação de linfócitos. Esse produto está em ensaio clínico de fase II em pacientes com psoríase severa (KANITAKIS et al., 2003; NESTLE e NICKOLOFF, 2004).

1.5. Plantas como estratégia para o desenvolvimento de novos medicamentos

Métodos modernos utilizados para o desenvolvimento de novas moléculas, como a química combinatória, têm apresentado de maneira geral pouco êxito no desenvolvimento de novos medicamentos (STROHL, 2000; CAUWENBERGH, 2002; MENDONÇA e BURDEN et al., 2003). Assim, fontes de substâncias naturais, incluindo os compostos derivados de plantas, têm sido utilizadas como estratégia para obtenção de novos compostos biologicamente ativos. A importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de fármacos é incontestável. A descoberta da atividade biológica destas substâncias não representou apenas o surgimento de grupos novos de medicamentos, mas possibilitou a identificação de novas intervenções terapêuticas. Não se conheciam anestésicos locais, bloqueadores musculares, anticolinérgicos, entre outras categorias terapêuticas, antes do isolamento e estudo da atividade da cocaína, da tubocurarina e da atropina, respectivamente (BRUNETON, 1993; CALIXTO et al., 2001).

Os compostos produzidos pelas plantas a partir de moléculas essenciais à sua vida, como carboidratos, proteínas e lipídeos são chamados de metabólitos secundários. Os metabólitos secundários eram considerados produtos de excreção do vegetal sem possuir função definida, sendo negligenciado seu estudo científico por muito tempo. Atualmente, suas funções

já foram reconhecidas, por exemplo: defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios UV e atração de polinizadores. Essas substâncias são divididas em grupos de acordo com suas estruturas e/ou origem biogênica. O número atualmente conhecido destas substâncias é de aproximadamente 140.000, divididos em grupos nomeados terpenos, flavonóides, taninos, cumarinas, lignanas, alcalóides, esteróides entre outros (PHILLIPSON, 1999; STROHL, 2000; VERPOORTE, 2000).

Apesar da evolução da química combinatória e da síntese de moléculas, as plantas têm a capacidade de produzir estruturas químicas raras com grande diversidade molecular devido a inúmeros genes que controlam a produção de enzimas responsáveis por esta biossíntese. Além disso, estes compostos são produzidos por organismos que têm sistemas homólogos aos dos mamíferos, conferindo assim uma alta chance de atividade biológica a estes compostos (GOTTLIEB et al., 2002; LEE, 2004). Um exemplo é a molécula do terpeno taxol, isolada da planta *Taxus brevifolia*, identificado em 1971 e aprovado para o tratamento de câncer no ovário nos Estados Unidos (1992). A síntese total dessa molécula só foi conseguida em 1994, entretanto, sua utilização na clínica foi considerada economicamente inviável (NISBET e MOORE, 1997; KINGSTON, 1994).

O maior grupo de metabólitos secundários presente no reino vegetal é o dos terpenos. Até o momento, já foram isolados aproximadamente 30.000 terpenos, número muito superior ao de qualquer outro grupo de produtos obtidos de fontes naturais. Os terpenos distribuem-se amplamente

na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores. São encontrados também em fungos, organismos marinhos, feromônios de insetos e em suas secreções de defesas. O número de unidades incorporado em determinado terpeno serve como base para a classificação desses compostos. Assim, os monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e os tetraterpenos ou carotenos possuem 2, 3, 4, 6 ou 8 unidades de isopreno respectivamente. Os terpenos vegetais desempenham funções importantes como defesa (fitoalexinas), repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, aleloquímicos, hormônios vegetais e por funcionarem como moléculas de sinalização (BRUNETON, 1993; MCCASKILL e CROTEAU, 1997; VEERPOTE, 2000) .

Muitos terpenos produzidos por plantas são de interesse farmacológico. O diterpeno taxol e os alcalóides derivados dos monoterpenos vincristina e camptoricina, por exemplo, são utilizados na clínica para o tratamento do câncer (MCCASKILL e CROTEAU, 1998). Triterpenos têm sido descritos como agentes antiinflamatórios, essa atividade tem sido atribuída a diversos mecanismos de ação, incluindo inibição da produção de eicosanóides e citocinas, peroxidação lipídica e interação com proteínas quinases (SAFAYHI e SAILER, 1997; HASMEDA et al., 1999; CALIXTO et al., 2003; CALIXTO et al., 2004).

Embora as plantas medicinais sejam utilizadas freqüentemente para tratamento e estratégia para o desenvolvimento de novos medicamentos (MANTLE et al., 2001), este recurso é ainda pouco explorado: a atividade

biológica foi avaliada somente em 6% das 250.000 espécies de plantas identificadas no mundo (VERPOORTE e MEMELINK, 2002; RATES, 2001).

1.6. Importância de plantas e metabólitos secundários no tratamento da inflamação cutânea

Diversos produtos dermatológicos contêm em sua composição terpenos isolados ou como componentes de extratos de plantas (DATTER, 2004). Entre as 300 plantas medicinais e produtos vegetais oficialmente avaliados pela Comissão E (corpo científico responsável pela validação de plantas medicinais na Alemanha), 40 são destinadas ao uso na dermatologia. Sendo que 10 destas plantas (Tabela 2) têm papel significativo na prática terapêutica, incluindo a arnica (*Arnica montana*), a camomila (*Matricaria recutita*) e a calêndula (*Calendula officinalis*). Estas plantas são largamente utilizadas pela população para o tratamento de inflamações cutâneas, sendo comprovado sua eficácia e segurança através de estudos científicos pré-clínicos e clínicos (BEDI e SHENEFELT, 2002). Diversos terpenos presentes na camomila (como os monoterpenos α -bisabolol e azuleno), na calêndula (como os triterpenos taraxasterol e o lupeol) e na arnica (como a sesquiterpeno lactona helenalina) são os responsáveis pelos efeitos antiinflamatórios destas plantas (BLUMENTHAL, 2003).

Tabela 2. Plantas medicinais utilizadas na prática terapêutica dermatológica segundo Comissão E (Alemanha).

PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NA PRÁTICA TERAPÊUTICA DERMATOLÓGICA		
Nome Científico	Nome Popular	Indicação Dermatológica
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila	Inflamações cutâneas e de mucosas
<i>Hamamelis virginiana</i>	Hamamélis	Lesões cutâneas brandas, hemorróidas
<i>Solanum dulcamara</i>	Doce amarga	Dermatites crônicas
<i>Oenothera biennis</i>	Prímula	Dermatite atópica, neurodermatite
<i>Calendula officinalis</i>	Calêndula	Ferimentos, ulcerações, cicatrização
<i>Echinacea purpurea</i>	Equinácea	Ferimentos superficiais de difícil cicatrização
<i>Hypericum perforatum</i>	Hipericum	Mialgias, queimaduras de primeiro grau
<i>Arnica Montana</i>	Arnica	Traumas cutâneos e musculares
<i>Symphythum officinale</i>	Confrei	Escoriações, estiramentos
<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi	Edema pós-traumático e pós-operatório

Fonte: Blumenthal, 2002.

Recentemente, no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina foram isolados triterpenos com núcleo pentacíclico (Figura 3) da planta *Protium kleinii*, identificados como sendo a α -amirina, β -amirina, breína, 3-ceto-11-hidroxi-ursa-12-eno, 3-oxo-11-hidroxi-olea-12-eno, 3-oxo-11-16-di-hidroxi-ursa-12-eno (Figura 4), sendo estes três últimos inéditos na literatura.

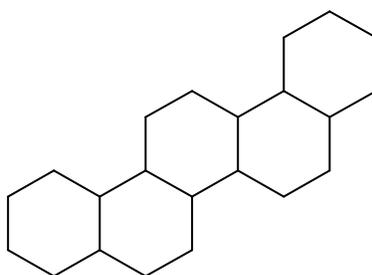


Figura 3 - Núcleo comum dos triterpenos pentacíclicos

Protium sp, o principal gênero da família Burceraceae e o mais freqüente na América do Sul, é composto por plantas utilizadas na medicina popular como cicatrizante, antiinflamatória e para o tratamento da úlcera no estômago (KHALID, 1983). Estudos fitoquímicos anteriores demonstraram a presença de lignanas na *Protium tenuifolium* e *Protium unifoliolatum*, cumarinas na *Protium opacum* e triterpenos como maniladiol e breína na *Protium heptaphyllum* (ZOGHBI et al., 1981; SIQUEIRA et al., 1995; SIANI et al., 1998). Além disso, estudo realizado por Siani e colaboradores (1999) demonstrou a atividade antiinflamatória nos óleos essenciais isolados das folhas e resinas de diferentes

espécies do gênero *Protium*, incluindo a *P. heptaphyllum*, *P. strumosum*, *P. lewellyni* e a *P. hebetatum*.

Protium kleinii (Figura 5) é uma espécie vegetal exclusiva da costa atlântica do sul do Brasil, encontrada somente nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Na medicina popular, sua goma é usada como emplastro aplicado em cima de bernês e as folhas e a casca são usadas no tratamento de inflamações cutâneas, gangrenas e úlceras (REITZ, 1981).

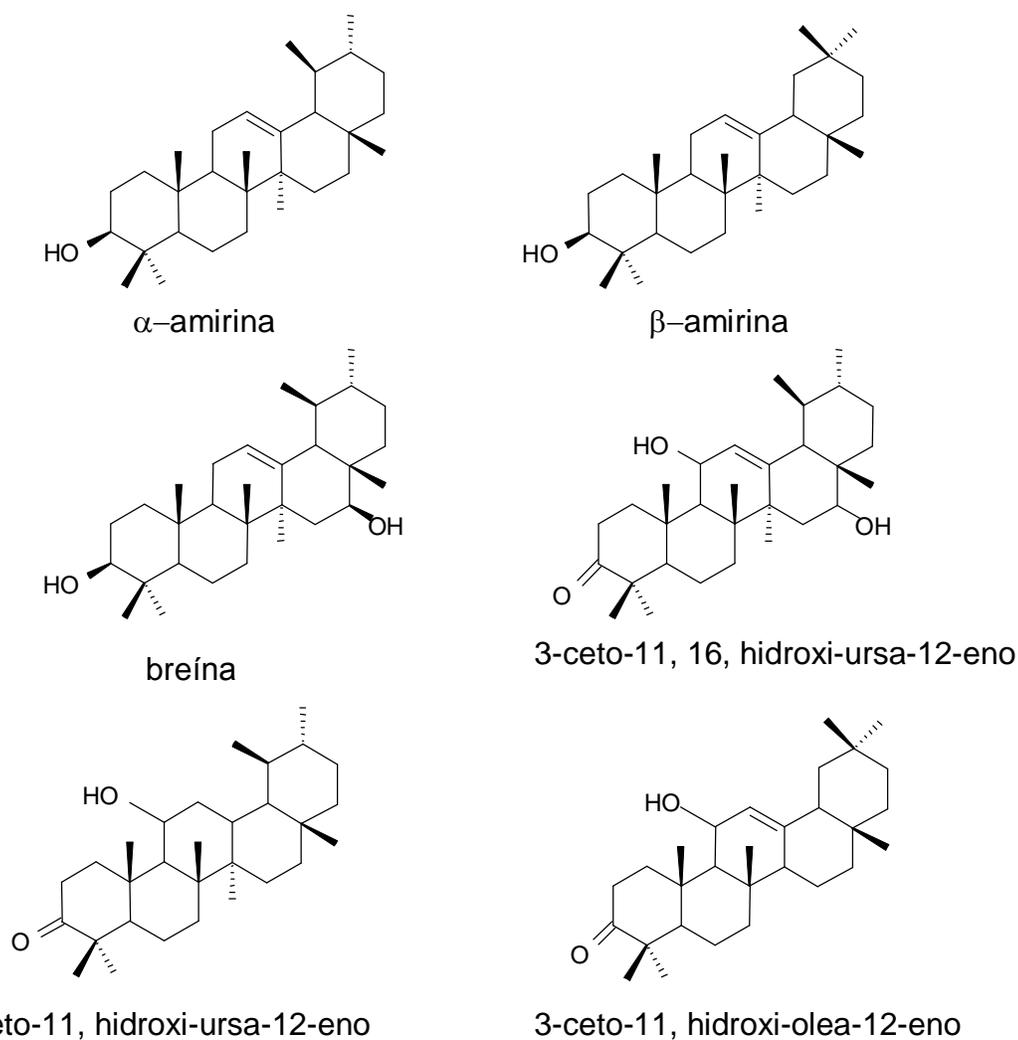


Figura 4 - Estrutura química de triterpenos pentacíclicos isolados da *P. kleinii*.

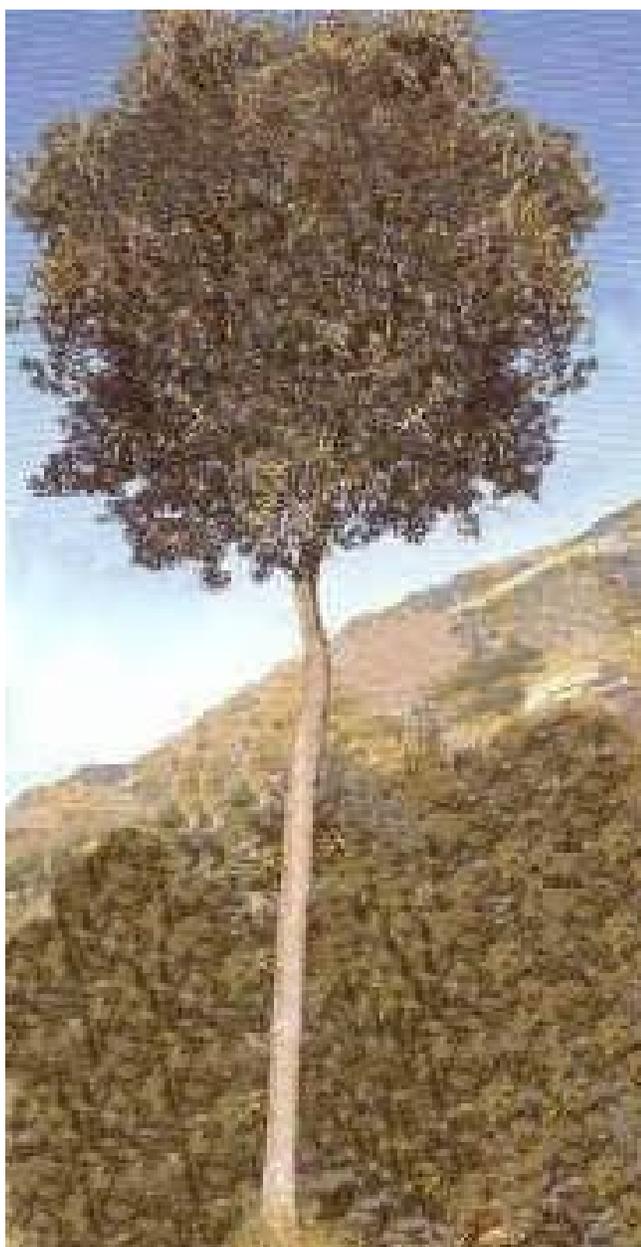


Figura 5 - Foto da planta *Protium kleinii*

Os triterpenos pentacíclicos são encontrados em diversas plantas, incluindo nas espécies do gênero *Protium*, e muitos estudos demonstraram seus efeitos antiinflamatórios em modelos de inflamação cutânea (para revisão ver SAFAYHI e SAILER et al., 1997). Os triterpenos pentacíclicos faradiol, taraxasterol e lupeol, isolados da *Calendula officinalis*, apresentam atividade antiinflamatória quando avaliados no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (DELLA LOGGIA et al., 1990). Neste mesmo modelo de inflamação cutânea podemos destacar a atividade antiinflamatória de diversos triterpenos pentacíclicos como, por exemplo, o ácido ursólico, betulina, ácido oleanólico, friedelina, ácido asiático entre outros (RECIO et al., 1995; GINER-LARZA et al., 2001). Inoue e colaboradores (1988; 1989 e 1996) demonstraram que o triterpeno pentacíclico ácido glicirritínico, isolado de plantas como *Glycyrra glabra* e *Luffa cylindrica*, e seus derivados foram efetivos em inibir o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico, TPA ou de capsaicina. A relevância destes compostos pode ser observada em países como o Japão, onde cremes contendo extrato da *Luffa cylindrica* (contendo ácido glicirrízico) são comercializados para o tratamento de patologias inflamatórias cutâneas e da irritação solar, sendo estes protegidos por três patentes internacionais (DARSHAN e DORESWAMY, 2004).

Entretanto, os estudos dos mecanismos da ação antiinflamatória destes triterpenos são escassos. Podemos destacar o triterpeno pentacíclico lupeol que apresenta atividade antiinflamatória em diversos modelos de inflamação cutânea relacionada com inibição da liberação de mediadores

inflamatórios como a prostaglandina E_2 , fator de necrose tumoral- α e a interleucina 1- β (Fernandez et al., 2001) assim como a inibição da expressão da enzima ciclooxigenase-2 e a ativação fator de transcrição nuclear- κ B (SALEEN et al., 2004).

Somando os fatos acima descritos e a carência de estudos científicos conclusivos a respeito do efeito antiinflamatório dos triterpenos pentacíclicos, procuramos avaliar, através de estudos farmacológicos pré-clínicos realizados *in vivo* e *in vitro*, os possíveis efeitos antiinflamatórios, bem como esclarecer alguns dos mecanismos envolvidos nessas ações a partir de extratos e triterpenos pentacíclicos isolados da planta *Protium kleinii*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar o efeito antiinflamatório de extratos e de compostos isolados da planta *Protium kleinii* em modelos de inflamação cutânea e investigar, através de técnicas farmacológicas, bioquímicas e de biologia molecular, alguns dos mecanismos que estão relacionados com a ação antiinflamatória desses compostos.

2.2. Objetivos Específicos

1-Analisar o efeito antiinflamatório de extratos e compostos isolados da *Protium kleinii* nos modelos de edema de orelha mediado pelo 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), ácido araquidônico, capsaicina, fenol, zimosan ou oxazolona em camundongos.

2- Avaliar a migração celular em tecido cutâneo no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA em camundongos tratados com extratos e compostos isolados da *Protium kleinii*.

3- Avaliar a atividade, a expressão de enzimas, os níveis de mediadores e fatores de transcrição induzido pelo TPA em camundongos tratados com extratos e/ou compostos isolados da *Protium kleinii*.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Isolamento e identificação química dos constituintes da P. kleinii

O material vegetal foi coletado no morro do Baú (Santa Catarina, Brasil) e foi classificado pelo Dr. Ademir Reis como sendo a espécie *Protium kleinii*. Uma amostra foi depositada no Herbário Barbosa Rodrigues (Itajaí-SC) com o código VC Filho 22. A casca do caule da *P. kleinii* foi triturada e macerada por 14 dias em temperatura ambiente com clorofórmio, hexano ou éter dietílico em uma proporção de 1:10 (peso/volume). O material depois de maceração foi evaporado sob baixa pressão gerando os extratos éter, clorofórmio e hexano. O extrato éter foi submetido à cromatografia líquida em coluna de sílica sendo adicionados como eluentes: hexano, hexano-acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila-metanol, metanol e água sucessivamente. Das frações eluídas foram isolados sólidos cristalinos identificados como: α -amirina, β -amirina, breína, 3-ceto-11-OH-ursa-12-eno, 3-oxo-11-OH-olea-12-eno e 3-oxo-11-16-di-OH-ursa-12-eno. A identificação dos compostos foi realizada com auxílio de espectro de ^1H e ^{13}C RMN (ressonância magnética nuclear).

3.2. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços (25-35 g) e ratos Wistar machos (120-160 g) mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFSC, em temperatura de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração. Os animais foram mantidos no laboratório para adaptação por um período de pelo menos 1 hora antes do início dos experimentos e foram usados somente uma vez em cada teste. Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Os protocolos experimentais foram encaminhados e aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3. Avaliação do edema de orelha

O edema foi expresso como o aumento da espessura (em μm) da orelha dos camundongos. A espessura da orelha foi medida antes e após a indução do processo inflamatório utilizando um micrômetro (Mitutoyo Serie 293). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e a sua espessura foi registrada em μm . Para minimizar variações devido à técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador. Os compostos, extratos e

agentes flogísticos foram dissolvidos em 20 µL de acetona e aplicados na orelha direita de camundongos.

3.4. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato)

O edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) na orelha direita de camundongos. Os extratos e compostos isolados da *P. kleinii* ou a dexametasona (utilizada como controle positivo) foram aplicados topicamente logo após a aplicação do TPA. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 6 h após a aplicação do agente flogístico (DE YOUNG et al., 1989). Biópsias (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) das orelhas dos camundongos foram coletadas 24 h após a aplicação do TPA e submetidas à avaliação histológica e da atividade da enzima mieloperoxidase (ver método a seguir), indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares.

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

O extrato éter, α -amirina ou a fenidona (inibidor dual da COX/LOX, utilizado como controle positivo) foram administrados topicamente, 30 min antes da aplicação de ácido araquidônico (2 mg/orelha) na orelha direita de camundongos. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 1 h após a aplicação do agente flogístico (YOUNG et al., 1984; CRUMMEY et al., 1987).

3.6. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina

Com o objetivo de avaliar o efeito do extrato éter ou da α -amirina em um modelo de inflamação cutânea neurogênica, os mesmos foram administrados topicamente, 30 min antes da aplicação da capsaicina (50 μ g/orelha) na orelha direita de camundongos. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 30 min após a aplicação do agente flogístico (GABOR e RAZGA, 1992).

3.7. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol

Com o objetivo de avaliar o efeito do extrato éter ou da α -amirina em um modelo de inflamação cutânea causada por um solvente, estes foram administrados topicamente, 30 min antes da aplicação de uma solução de 10% (v/v) de fenol em acetona (20 μ l/orelha) na orelha direita de camundongos. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 2 h após a aplicação do solvente irritante (LIM et al., 2004).

3.8. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de zimosan

O zimosan, polissacarídeos da parede celular de fungos, é utilizado como agente indutor de inflamação em diversos modelos animais como edema de pata, peritonite, pleurisia, dermatites entre outros. A resposta inflamatória causada pelo zimosan é atribuída à ativação do sistema complemento e a liberação de interleucina-1 de macrófagos, neutrófilos entre outras células.

Para avaliar o efeito do extrato éter da *P. kleinii* e da α -amirina frente a uma resposta inflamatória causada por microorganismos, o zimosan foi suspenso em salina estéril na concentração de 1% (p/v) e aplicado (com uma microseringa) intradermicamente nas orelhas (10 μ l por orelha) de camundongos. O extrato éter da *P. kleinii* e a α -amirina foram administrados por via tópica, juntamente com aplicação do zimosan e o edema avaliado 6 h após a aplicação do mesmo (ERDO et al., 1993).

3.9. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de oxazolona

A sensibilização dos camundongos foi realizada com a aplicação tópica de 50 μ l de uma solução de oxazolona a 2% (p/v) em acetona na parte ventral dos animais em dois dias consecutivos. Após 6 dias o desafio foi realizado. Para tal, 30 μ l de uma solução de oxazolona a 2% foi administrada topicamente nas orelhas dos camundongos. O extrato éter da *P. kleinii* ou a α -amirina foram administrados por via tópica 3 h após cada aplicação de oxazolona e o edema avaliado 96 h após o desafio (RECIO et al., 2000). Após a avaliação do edema, biópsias (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) das orelhas dos camundongos foram coletadas e submetidas à avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (ver método a seguir), indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares.

3.10. Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA

Para avaliar o possível efeito curativo da α -amirina em um processo inflamatório pré-estabelecido, utilizamos um modelo de inflamação crônica. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação de 20 μ l de TPA (2 μ g/orelha) em dias alternados durante 9 dias. A α -amirina e o glicocorticóide dexametasona (utilizado como controle positivo), dissolvidos em 20 μ l de acetona, foram aplicados topicamente durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do experimento (STANLEY et al., 1991). Após a avaliação do edema no último dia biopsias (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) das orelhas dos camundongos foram coletadas e submetidas à avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase e *N*-acetil- β -*D*-glucosaminidase (ver método a seguir), indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, respectivamente.

3.11. Medida da atividade enzimática da mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando metodologia de Bradley e colaboradores (1982) modificada por De Young e colaboradores (1989). As biópsias (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram adicionados a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado por cerca

de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, 85 µL, PBS 0,22 M pH 5,4 e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi incubada a 37°C por 3 min e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) na absorvância de 630 nm e expressa como mDO/biopsia.

3.12. Análise histológica

Amostras de orelhas coletadas de camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA foram fixadas em formalina tamponada a 4%. As orelhas foram desidratadas, blocadas em parafina, seccionadas em cortes de 3-4 µm e corados com hematoxilina e eosina ou PAS (ácido periódico de Schiff) (RECIO et al., 2000). Para avaliação da espessura da epiderme foi utilizada lente ocular graduada. A infiltração celular (leucócitos) foi avaliada em áreas representativas em aumento de 200 e/ou 400x.

3.13. Medida da atividade enzimática da NAG (*N*-acetil- β -D-glucosaminidase)

A atividade da enzima NAG, utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares, foi avaliada no modelo de inflamação causada pela aplicação repetida de TPA na orelha dos camundongos, utilizando metodologia de Sanchez e Moreno (1999). As biópsias (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram adicionados a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram adicionadas em microtubos e centrifugadas a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 25 μ L do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionados 100 μ L de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 μ L de p-nitrofenil-acetamida- μ -D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido em dimetilformamida. A seguir a placa foi incubada a 37°C por 1 h e a reação foi interrompida pela adição de 30 μ L de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) na absorvância de 405 nm e expressa como mDO/biopsia.

3.14. Avaliação dos níveis de Interleucina-1 β (IL-1 β)

O nível tecidual da citocina IL-1 β foi avaliado 6 h após a aplicação do TPA nas orelhas de camundongos utilizando o método de ELISA como descrito previamente por Pinheiro e Calixto (2002) com pequenas modificações. As biópsias (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram homogeneizados em um tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de fluoreto de feniltmetilsulfonil (PMSF), 0,1 mM cloreto de benzametônio, 10 mM de EDTA e 20 μ M de aprotinina e centrifugadas a 3000 x g por 10 min, o sobrenadante foi coletado e estocado para análise posterior. Os níveis de IL-1 β foram avaliados utilizando um kit de ELISA (R&D System, EUA), seguindo instruções do fabricante.

3.15. Avaliação dos níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂)

Para avaliação dos níveis de PGE₂ foi empregado o método descrito por Lloret e Moreno (1995). Para tal, biópsias (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) retiradas dos camundongos 6 h após a aplicação de TPA, foram imediatamente homogeneizadas em 1 ml de metanol contendo 1% de HCl 1M. A seguir, foi adicionado 2 ml de água destilada em cada tubo e os mesmos conservados em gelo por 30 min. As proteínas insolúveis foram removidas por centrifugação (30000 x g por 20 min). A PGE₂ foi extraída com acetato de etila (6 ml), sendo a fase aquosa descartada. A fase orgânica foi evaporada a vácuo e o

material resultante da extração foi avaliado utilizando um kit de ELISA (Amershan Pharmacia Biotech, Inglaterra), seguindo instruções do fabricante.

3.16. Avaliação da atividade das enzimas COX-1 e COX-2

A atividade da enzima COX-1 e da COX-2 foi medida *in vitro* pelo Ensaio Colorimétrico para Detecção de Inibidores da COX (Cayman Chemical, Ann Arbor, EUA). O ensaio foi conduzido conforme recomendação do fabricante. A atividade peroxidase da COX-1 ou COX-2 ovinas foi avaliada pelo aparecimento da N' tetrametil-*p*-fenilenediamina (TMPD) oxidada em 590 nm. A reação foi realizada na presença de α -amirina (1-30 μ M) ou de DMSO (1%, veículo usado para diluir as drogas e utilizado como controle). Os dados foram expressos como porcentagem da atividade em relação ao grupo controle.

3.17. Extração de proteínas citosólicas e nucleares

Nesta série de experimentos, os tecidos foram preparados como descrito por Sabourin e colaboradores (2002) com algumas modificações. As biópsias de orelhas de camundongos foram congeladas e armazenadas em freezer a -70°C até o momento do uso. Os extratos protéicos foram preparados como descrito por Ialenti e colaboradores (2001) com algumas modificações. As biópsias foram colocadas em tampão de lise gelado (HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 1,5 mM de MgCl_2 , 10 mM de KCl, 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na_3VO_4 , 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de inibidor de tripsina, 7 $\mu\text{g/ml}$ de pepstatina A, 5 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina e 10 $\mu\text{g/ml}$ de

aprotinina) e homogeneizados por 20 s, duas vezes. O homogenato foi centrifugado a 10000 x g por 30 min e o sobrenadante foi separado como a fração citosólica das preparações. O pellet foi re-suspenso em tampão com alta concentração de sal (HEPES 20 mM (pH 7,9), contendo: 420 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de EDTA, 25% v/v de glicerol, 0,5 mM de PMSF, 0,5 mM de DTT, 1,5 µg/ml de inibidor de tripsina, 7 µg/ml de pepstatina A, 5 µg/ml de leupeptina e 10 µg/ml de aprotinina) e incubado sob agitação constante a 4°C por 30 min. O homogenato foi centrifugado a 10000 x g por 30 min, sendo o sobrenadante coletado como a fração nuclear das preparações. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando o kit Bio-Rad para determinação de proteínas (*Bio-Rad Protein Assay Kit*) segundo recomendações do fabricante. As frações citosólica e nuclear foram armazenadas em freezer a -70°C até o momento do uso.

3.18. Avaliação dos níveis da enzima COX-2, p38 MAPK, ERK e JNK pelo ensaio de Western Blot

Com o objetivo de avaliar as possíveis alterações no padrão de expressão das proteínas COX-2, e as MAP quinases p38, ERK e JNK na pele de camundongos foi utilizado a técnica de *western blot*. Para tal, biópsias (círculos de 6 mm de diâmetro de tecido da orelha dos camundongos) foram coletadas 30 min e 6 h após a aplicação tópica do TPA para avaliação dos níveis das MAP quinases e COX-2, respectivamente. A fração citosólica de extratos de biópsias de orelhas, obtida como descrito anteriormente foi submetida à eletroforese em

gel desnaturante e SDS-poliacrilamida (10-12%), sendo logo depois transferida para uma membrana de polivinilidenodifluorido (PVDF). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (5%) e posteriormente incubada com anticorpo policlonal para a COX-2, p38 MAPK, ERK e JNK (Santa Cruz Biotechnology, EUA). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

3.19. Avaliação da ativação do fator de transcrição NF- κ B pelo ensaio da mobilidade por deslocamento em gel (EMSA)

Para avaliar a ativação do fator de transcrição NF- κ B, a fração nuclear obtida de extrato de orelhas de camundongos coletadas 30 min após a aplicação tópica de TPA, foi submetida ao ensaio de deslocamento da ligação em gel por eletroforese. O EMSA foi realizado utilizando o *Kit Gel Shift Assay System* (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o oligonucleotídeo de dupla-fita com consenso específico para o NF- κ B (5'-GATCAGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') foi marcado nas extremidades com [γ ³²P]ATP (DuPont, Inglaterra) na presença da T₄ polinucleotídeo quinase por 10 min a 37°C. Os nucleotídeos não incorporados foram removidos quando a mistura foi eluída em uma coluna de Sefadex G-25 (Amersham Pharmacia

Biotech., Inglaterra). Os extratos nucleares foram incubados com tampão de ligação (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo: 1 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 4% glicerol e 1 µg de poli-dIdC) durante 20 min em temperatura ambiente, em um volume final de 20 µl. Posteriormente, cada amostra foi incubada por 30 min em temperatura ambiente com aproximadamente 25000 cpm do oligonucleotídeo-[³²P]. O complexo proteína-DNA foi avaliado em gel não-desnaturante de acrilamida/bisacrilamida em 0,25 x de tampão Tris-borato/EDTA (TBE) a 150 V por 2 h. Logo em seguida, o gel foi seco por vácuo e analisado utilizando o sistema de *Phosfo-imager* FUJIX BAS 2000 (Alemanha).

3.20. Ensaio de união específica para a [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal de ratos.

Para confirmar a falta de eficácia do triterpeno α-amirina em prevenir o edema de orelha induzido pela capsaicina foi realizada a união específica para [³H]-resiniferatoxina (agonista de receptores vanilóides assim como a capsaicina) como descrito previamente por Szallasi e colaboradores, 1998. Para a obtenção das membranas, a medula espinhal de ratos foi removida e homogeneizada em tampão A gelado (pH 7,4) contendo: (em mM) KCl 5; NaCl 5,8; MgCl₂ 2; CaCl₂ 0,75; glicose 12; sacarose 137 e ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico (HEPES), 10. O homogenato foi primeiramente centrifugado por 10 min a 1,000 g a 4 °C, o pellet resultante desta centrifugação foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 35,000 g por 30 min a 4 °C. O

pellet resultante foi ressuspenso em tampão A e estocado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia do experimento.

O ensaio foi realizado em duplicata com um volume final de $500\ \mu\text{l}$, contendo tampão A, com $0,25\ \text{mg/ml}$ de soro albumina bovina, membrana ($100\ \mu\text{g/proteína}$) e $50\ \text{pM}$ de $[^3\text{H}]$ -resiniferatoxina. Para a obtenção da união de inibição, foram utilizadas diferentes concentrações ($0,01$ - $10\ \mu\text{M}$) de capsaicina, ou α -amirina ($30\ \mu\text{M}$). Para a medida da união inespecífico, $100\ \text{nM}$ de resiniferatoxina não-radioativo foi incubado em alguns tubos. A reação foi realizada transferindo os tubos para um banho com água a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após um período de $60\ \text{min}$ de incubação, a reação foi parada pela transferência dos tubos para um recipiente contendo gelo. $100\ \mu\text{g}$ de α_1 -ácido glicoproteína bovina foi adicionada em cada tubo para reduzir a união inespecífica. Finalmente, membrana ligada e livre foi separada por centrifugação durante $15\ \text{min}$ a $20,000\ \text{g}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A união específica foi quantificada por contagem em cintilador. A união específica foi calculada como a diferença da união total e inespecífica.

3.21. Ensaio de união específica para $[^3\text{H}]$ -dexametasona em pulmão de ratos

Com objetivo de avaliar a possível interação do triterpeno α -amirina com os receptores para glicocorticóides, tecidos de pulmão de ratos foram homogeneizados em tampão ($10\ \text{mM}$ de HEPES-pH $7,5$, $1\ \text{mM}$ de EDTA , 20

mM de molibdato de sódio, glicerol 10% e DTT 1 mM) e submetidos a centrifugação (30 000 x g). O ensaio de união específica para receptor de glicocorticóide foi realizado utilizando a [³H]-dexametasona como descrito por Kalimi e Hubbard (1983) com pequenas modificações. Resumidamente, o sobrenadante dos tecidos homogeneizados (50 µL, ~ 2 mg de proteína) foi incubado em tampão de ensaio (25 nM [³H]-dexametasona, 10 mM HEPES, 1mM EDTA, 20 mM molibdato de sódio, pH 7,5) por 24 h a 0 °C. A reação foi interrompida e os receptores livres de ligação foram separados por dextrana-carvão ativado (150 µL 2% carvão ativado/ 0,2% dextrana, PM 40 kDa). Após a homogeneização e centrifugação a 10 000 x g por 5 min, o sobrenadante foi coletado e a radioatividade foi medida por cintilação líquida. A união não específica (não mais que 20% da união específica total) foi avaliada pela adição de 25 µM (1000 vezes em excesso) de dexametasona não radioativa e o composto teste (α -amirina) foi avaliada nas concentrações de 1 a 30 µM.

3.22. Irritação primária de pele em camundongos em dose simples e repetidas

A determinação do potencial irritante e/ou dos efeitos corrosivos de uma substância aplicada sobre a pele de mamíferos constitui uma etapa importante que indica os prováveis resultados da pele humana em exposição a esta substância (BRITO, 1994). Por definição:

Irritação dérmica é a produção de uma resposta inflamatória na pele, reversível, frente à aplicação de uma substância-teste.

Corrosão dérmica é a produção de danos irreversíveis sobre a pele em consequência da aplicação de uma substância-teste (BRITO, 1994).

Os parâmetros avaliados foram a formação de eritema e edema. O edema foi verificado segundo o aumento da espessura da orelha dos camundongos conforme descrito anteriormente e o eritema foi classificado em grau zero (sem eritema), grau um (eritema leve), grau dois (eritema bem definido), grau três (eritema moderado) e grau quatro (eritema grave vermelho violeta com formação de escaras). O eritema e o edema foram avaliados 1, 24 e 72 horas e 14 dias após a aplicação tópica da α -amirina (1mg/orelha) ou do agente irritante lauril éter sulfato de sódio (20 μ l de uma solução a 5%, v/v) nas orelhas dos camundongos.

Se a α -amirina for capaz de induzir a produção de edema ou eritema em qualquer um destes pontos de avaliação ela será considerada uma substância irritante. Caso o eritema e/ou edema forem observados por mais de 14 dias após a aplicação da α -amirina, seu efeito pode ser considerado corrosivo.

Para a avaliação do potencial irritativo de repetidas aplicações da α -amirina, esta foi aplicada topicamente (1mg/orelha) a cada 48 horas durante 10 dias, a avaliação foi realizada 24 horas após cada aplicação seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

3.23. Fotossensibilização cutânea em camundongos

Uma substância aplicada topicamente pode causar uma resposta inflamatória quando a pele for exposta à radiação ultravioleta. Esta resposta é caracterizada por prurido, eritema, edema, pápulas, vesículas e bolhas (BRITO, 1994). Trinta minutos após a aplicação tópica da α -amirina (1mg/orelha) ou do controle positivo psoraleno (0,5 mg/orelha), os camundongos foram expostos à radiação ultravioleta durante 20 min. Como fonte de radiação foi utilizado uma lâmpada fluorescente com comprimento de onda de 315 a 400 nm. O eritema e o edema foram avaliados 1, 24 e 48 horas após a exposição dos camundongos conforme descrito anteriormente (BRITO, 1994).

3.24. Drogas e reagentes

As drogas e reagentes usados foram: 12-O-tetradecanoylphorbol acetato, ácido araquidônico, capsaicina, dexametasona, fenidona, HTAB, TMB, peróxido de hidrogênio, Tween 20, Tween 80, phenylmethylsulphonyl fluoride, cloreto de benzametônio, EDTA, DTT, tripsina, pepstatina, aprotinina, leupeptina tampão fosfato, eosina, hematoxilina, p-nitrofenil-acetamida- μ -D-glicopiranosídeo, PMSF, [³H]-dexametasona, zimosan, oxazolona (Sigma Chemical Co, EUA), acetato de sódio, dimetilformamida, acetona, formaldeído, fenol, etanol absoluto, metanol, NaCl, NaF (Merck Biosciences, Germany), HEPES (GIBCO), anticorpo policlonal COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, EUA), [³H]-resiniferatoxina (Perkin Elmer Life Science, EUA), lauril éter sulfato de sódio e psoraleno (Henkel, Brasil).

3.25. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das DI_{50} (dose de α -amirina ou do extrato éter necessárias para reduzir em 50% as respostas inflamatórias em relação ao grupo controle), que são representados como a média geométrica acompanhada de seu respectivo intervalo de confiança 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Dunnett ou Student Newman Keuls quando necessário. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA

A Figura 6 demonstra que ao contrário do que foi observado para o extrato clorofórmio e hexano, o extrato éter da *P. kleinii* foi capaz de inibir o edema de orelha causado pela aplicação de TPA. Este efeito foi confirmado na Figura 7, onde o extrato éter (0,3-3,0 mg/orelha), inibiu de maneira dependente da dose tanto o edema quanto a atividade da enzima mieloperoxidase (indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares) em biópsias das orelhas de camundongos. As inibições encontradas foram de 70 ± 5 e $83 \pm 6\%$ e as DI_{50} médias calculadas foram de 0,55 (0,38-0,64) e 0,72 (0,65-0,82) mg/orelha, respectivamente para edema e atividade da mieloperoxidase.

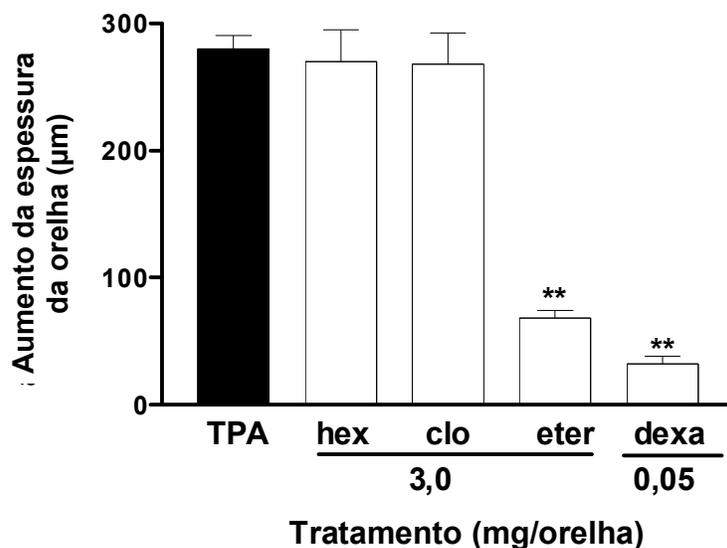


Figura 6. Efeito do extrato éter (éter), extrato hexano (hex), extrato clorofórmio (clo) obtidos da *P. kleinii* e da dexametasona (dexta) administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo TPA. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (TPA), $**P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

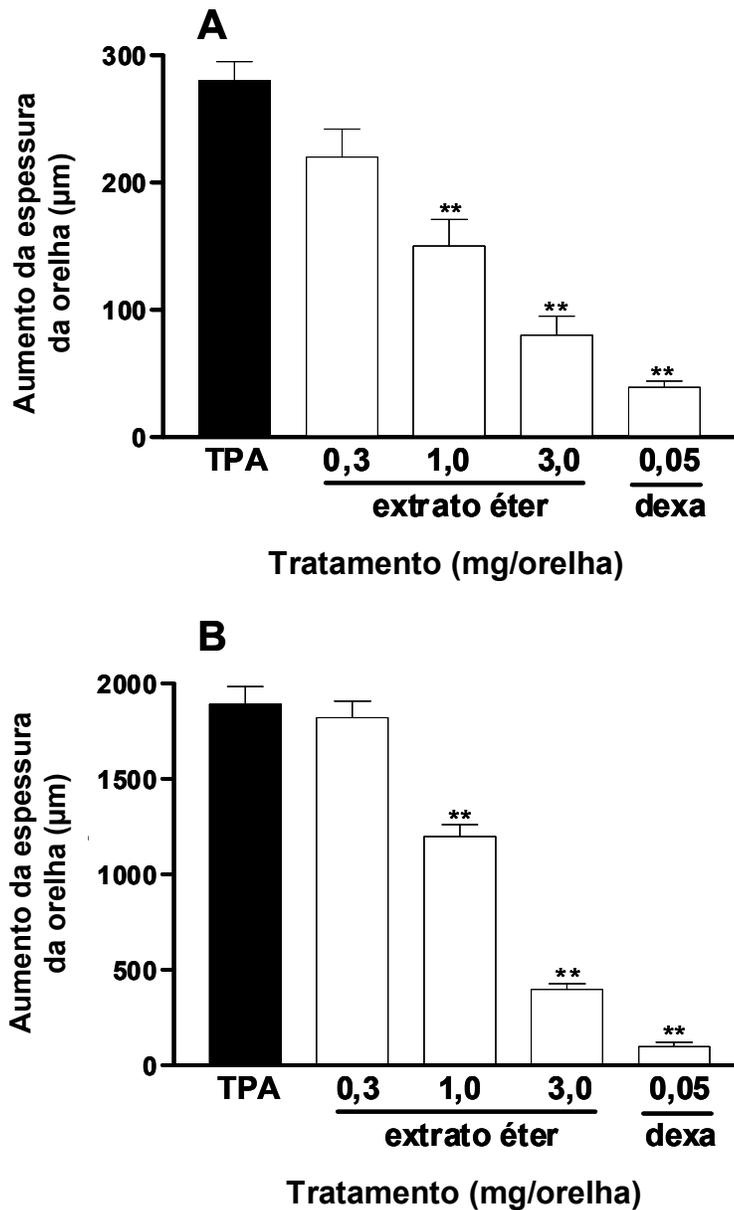


Figura 7. Efeito do extrato éter da *P. kleinii* ou da dexametasona (dexta) administrados topicamente sobre o edema de orelha (**A**) e na atividade da enzima mieloperoxidase (**B**) de orelhas tratadas com TPA. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, *P<0,05 e **P<0,01 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Devido ao marcante efeito antiinflamatório tópico observado para o extrato éter no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA, este extrato foi submetido a diversos procedimentos cromatográficos para isolamento e identificação dos compostos responsáveis pelo seu efeito antiinflamatório. Esta análise química permitiu o isolamento de três triterpenos pentacíclicos: breína, α -amirina e AF -29 (3-oxo-11-OH-olea-12-eno) e uma mistura de dois triterpenos pentacíclicos isômeros: CB-25 (3-oxo-11-16-di-OH-ursa-12-eno e 3-ceto-11-OH-ursa-12-eno) (Figura 4). Conforme indicado na Figura 8, todos os triterpenos foram capazes de inibir de maneira significativa o edema de orelha causado pela aplicação de TPA com as seguintes inibições: 55 ± 6 , 22 ± 4 , 33 ± 5 , e $67 \pm 7\%$ respectivamente, para breína, AF-29, CB-25 e α -amirina.

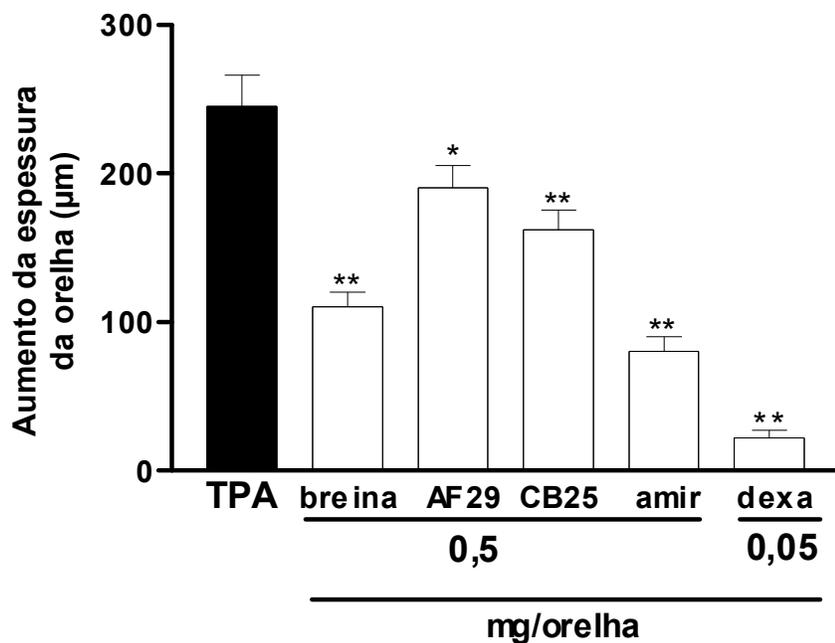


Figura 8. Efeito da breina, AF-29, CB-25, α -amirina (amir) ou dexametasona (dexta) administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo TPA. Cada coluna representa a media \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Devido ao maior rendimento e a melhor eficácia frente ao modelo de edema de orelha mediado pelo TPA, a α -amirina foi selecionada entre os compostos isolados da *P. kleinii* para estudo de seu efeito antiinflamatório.

Os resultados da Figura 9 demonstram que a α -amirina apresenta perfil antiinflamatório semelhante aquele observado para o extrato éter da *P.kleinii* quando avaliado no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA. As inibições observadas foram 75 ± 3 e $78 \pm 4\%$ e as DI_{50} médias calculadas foram de 0,31

(0,21-0,60) e 0,45 (0,28-0,54) mg/orelha, respectivamente para o edema e a migração de leucócitos polimorfonucleares (atividade da mieloperoxidase).

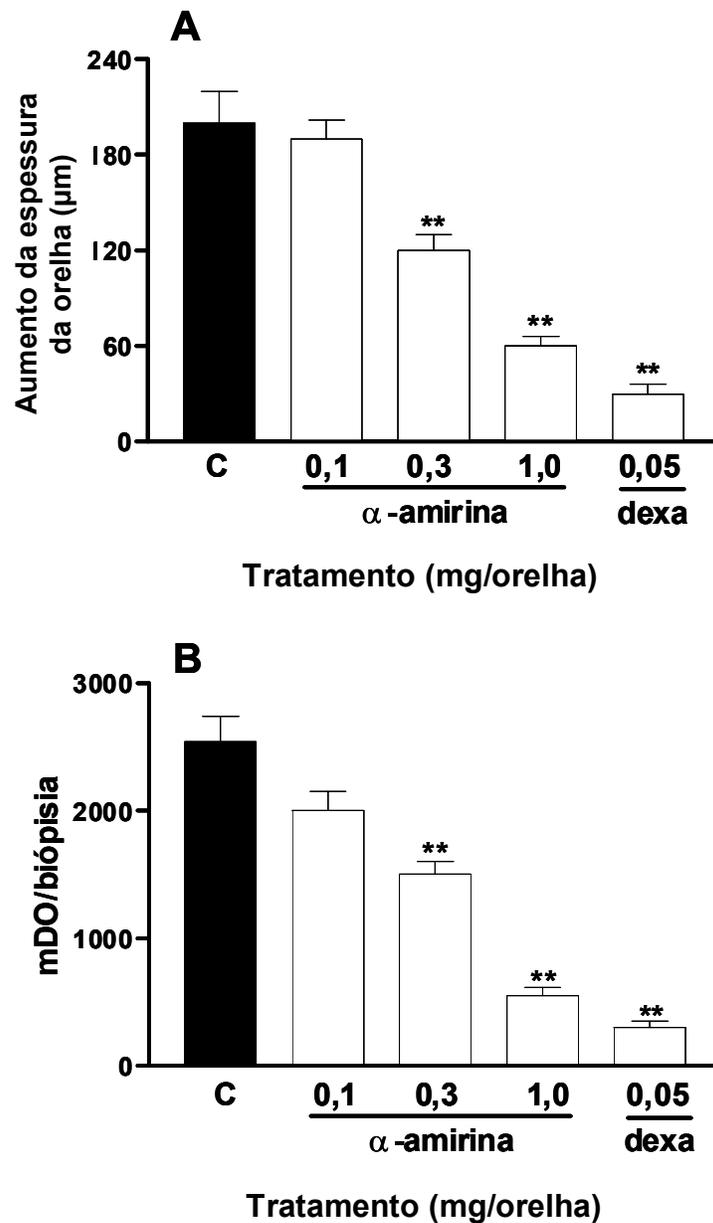


Figura 9. Efeito da α -amirina e da dexametasona (dexta) administradas topicamente sobre o edema de orelha (**A**) e a atividade da enzima mieloperoxidase (**B**) de orelhas tratadas com TPA. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.2. Análise histológica

Conforme mostra a Figura 10, 24 h após a aplicação de TPA os cortes histológicos das orelhas dos camundongos demonstram intensa infiltração celular (polimorfonucleares) na derme além de edema. Estes eventos foram drasticamente reduzidos pela aplicação tópica do extrato éter (3 mg/orelha), da α -amirina (1mg/orelha) ou de dexametasona (0,05 mg/orelha).

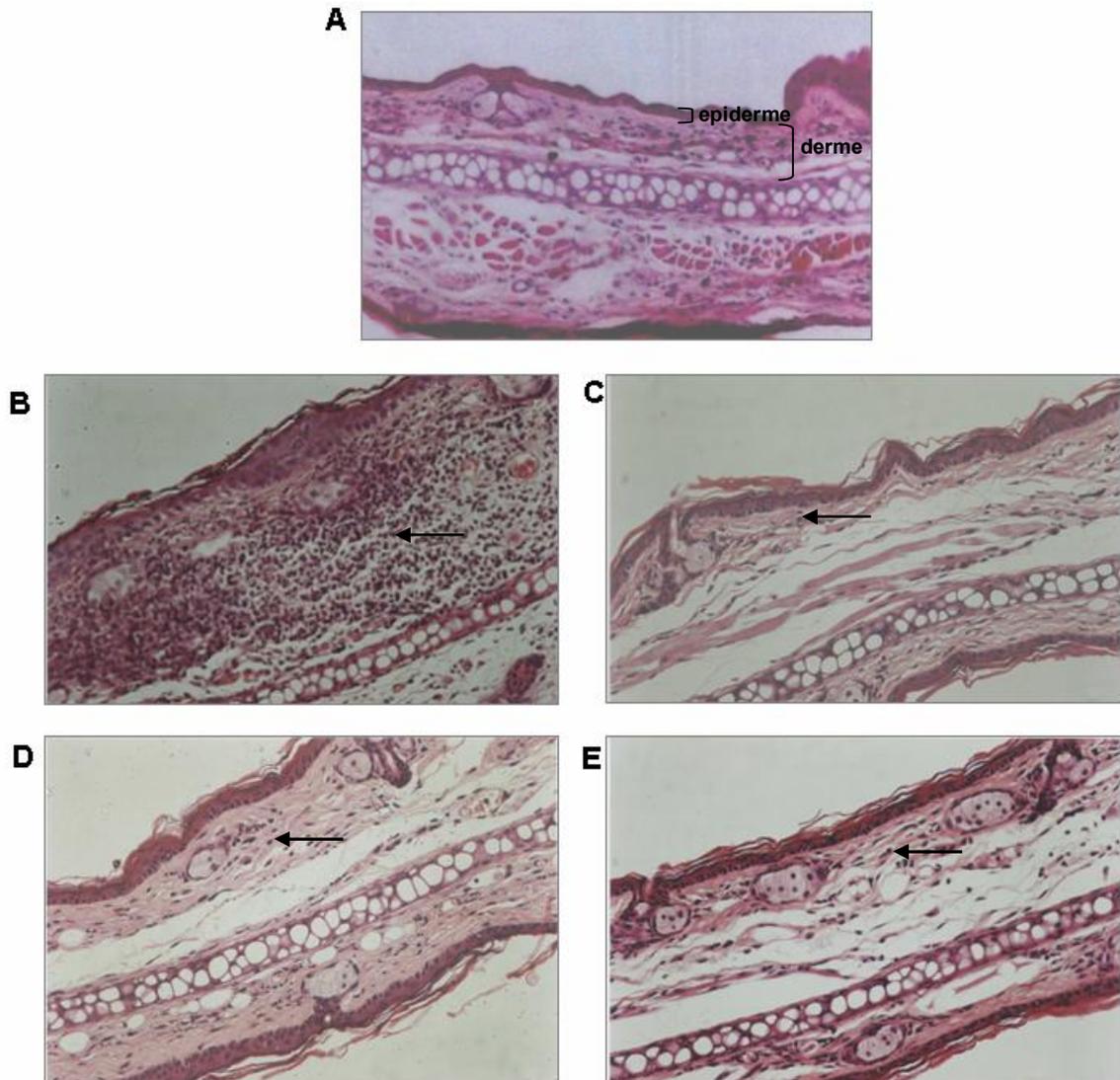


Figura 10. Cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x) 24 h após a aplicação de TPA. **(A)** animal tratado com veículo (acetona), **(B)** controle, **(C)** extrato éter de *P. kleinii* (3 mg/orelha), **(D)** α -amirina (1 mg/orelha) e **(E)** dexametasona (0,05 mg/orelha). As flechas indicam polimorfocelulares na derme.

4.3. Edema de orelha induzido pela aplicação de capsaicina

A aplicação tópica de capsaicina provocou extravasamento plasmático e conseqüentemente edema. Conforme demonstra a Figura 11 o pré-tratamento dos animais com o extrato éter (3 mg/orelha) ou com a α -amirina (1 mg/orelha) não preveniu de forma significativa a formação do edema de orelha em camundongos causado pela capsaicina.

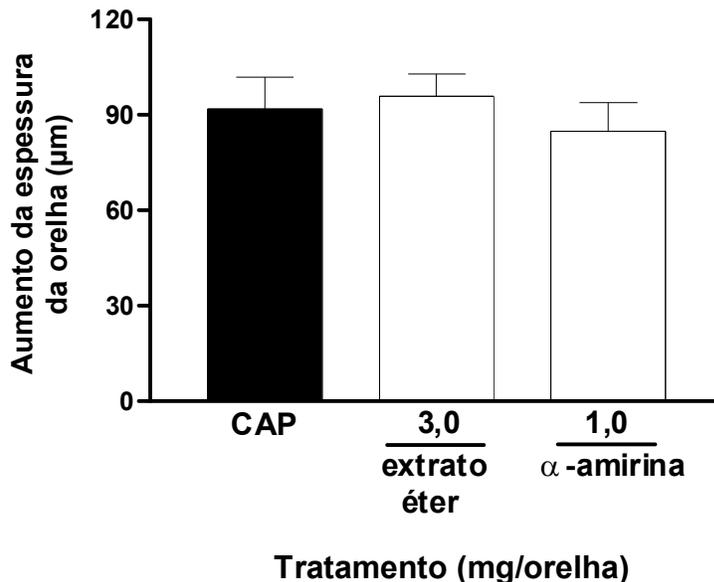


Figura 11. Efeito do extrato éter de *P. kleinii* e da α -amirina administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pela capsaicina (CAP). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.4. Ensaio de união específica para a [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal de ratos

A Figura 12 demonstra que a α -amirina (30 μ M) não foi capaz de inibir a união específica da [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal de ratos. Ao contrario, a capsaicina (0,1 –10 μ M), conhecido ligante de receptores vanilóides, causou significativa inibição de maneira concentração dependente com inibição máxima de 93 \pm 5% na concentração de 0,1 a 10 μ M sobre o sítio de ligação da [³H]-resiniferatoxina.

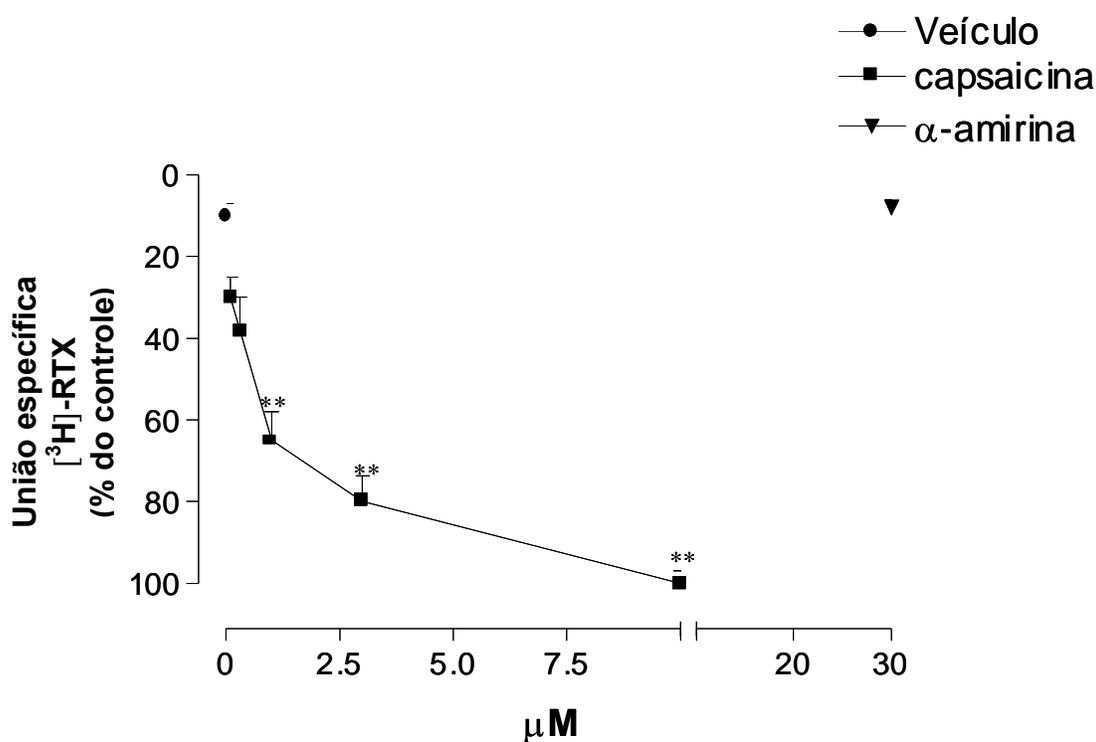


Figura 12. Efeito da α -amirina e da capsaicina sobre a união específica da [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal de ratos. Cada ponto representa a média \pm E.P.M de três experimentos realizados em duplicata. ** $P < 0,01$ difere significativamente do controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnetts).

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

A aplicação tópica de ácido araquidônico provocou resposta inflamatória rápida e intensa na orelha de camundongos, que é preferencialmente reduzida por inibidores da enzima lipoxigenase (YOUNG et al., 1984). Ao contrário do inibidor dual da cicloxigenase-lipoxigenase fenidona (2 mg/orelha), a aplicação tópica do extrato éter (3 mg/orelha) ou da α -amirina (1 mg/orelha) não foi eficaz em inibir o edema mediado pelo ácido araquidônico (Figura 13).

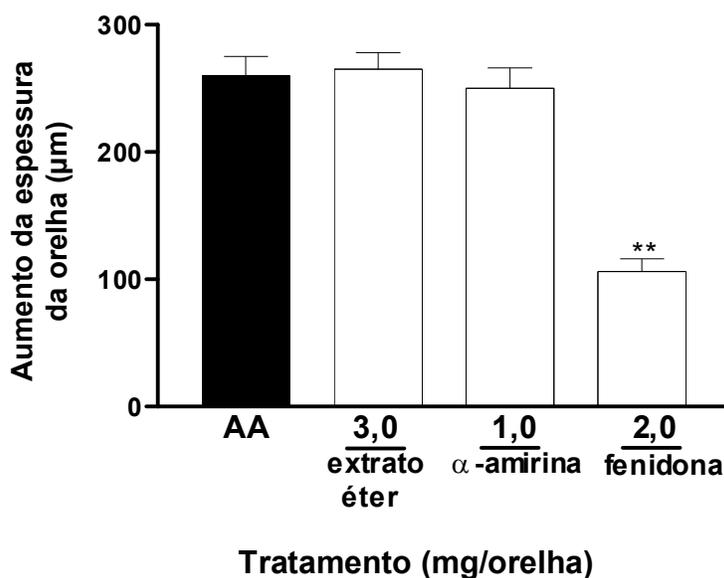


Figura 13. Efeito do extrato éter da *P. kleinii*, da α -amirina e da fenidona administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (AA). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significancia quando comparado com o grupo controle (AA). Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.6. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol

A aplicação tópica de fenol provocou aumento significativo da espessura da orelha de camundongos, este aumento foi máximo 2 h após a aplicação do agente irritante. Conforme demonstra a Figura 14 o pré-tratamento dos animais com o extrato éter (3 mg/orelha), α -amirina (1 mg/orelha) ou com a dexametasona (0,05 mg/orelha) preveniu de forma significativa a formação do edema de orelha em camundongos causado por este agente irritante. As inibições observadas foram 25 ± 5 , 23 ± 4 e $42 \pm 2\%$, respectivamente para extrato éter, α -amirina e dexametasona.

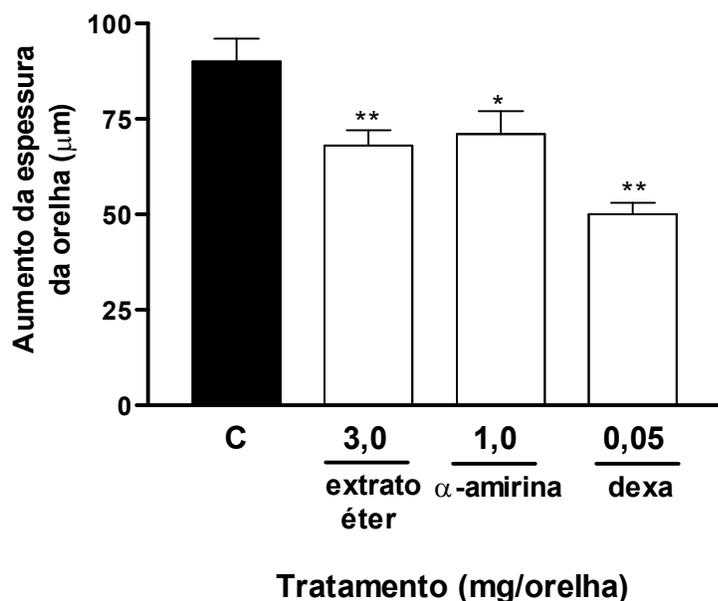


Figura 14. Efeito do extrato éter de *P. kleinii*, α -amirina ou dexametasona administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo fenol. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.7. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de zimosan

Os resultados da Figura 15 demonstram que o extrato éter da *P. kleinii*, o α -amirina e a dexametasona foram capazes de prevenir o edema causado pela injeção intradérmica de polissacarídeos de parede celular de fungos, o zimosan. As inibições observadas foram 60 ± 6 , 64 ± 7 e $81 \pm 3\%$, respectivamente para o extrato éter, α -amirina e a dexametasona.

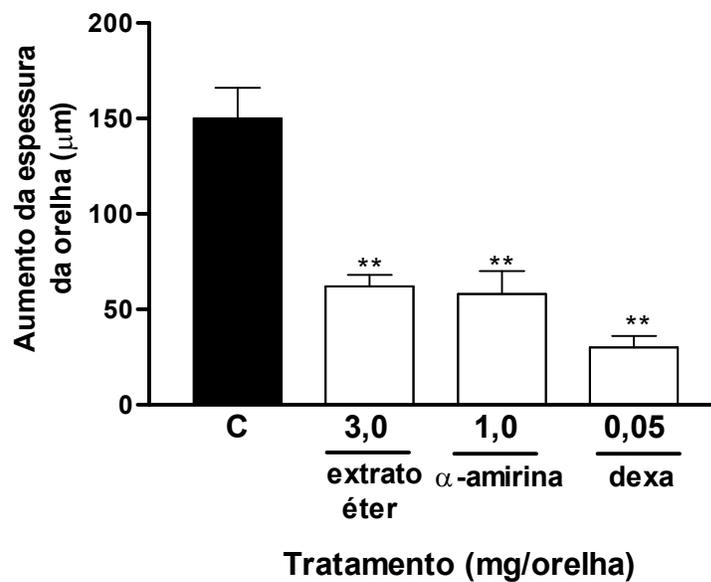


Figura 15. Efeito do extrato éter de *P. kleinii*, α -amirina ou dexametasona administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo zimosan. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.8. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de oxazolona

Os resultados da Figura 16 demonstram que a resposta inflamatória (edema e migração celular) gerada pela sensibilização causada pela oxazolona na pele de camundongos foi reduzida com a aplicação tópica da α -amirina, extrato éter da *P.kleinii* e dexametasona. As inibições observadas foram 55 ± 6 , 52 ± 5 e $73 \pm 2\%$ para o edema e 51 ± 3 , 49 ± 5 e $87 \pm 2\%$ para a migração de leucócitos polimorfonucleares (atividade da mieloperoxidase), respectivamente para extrato éter, α -amirina e dexametasona, 96 horas após a sensibilização causada pela oxazolona.

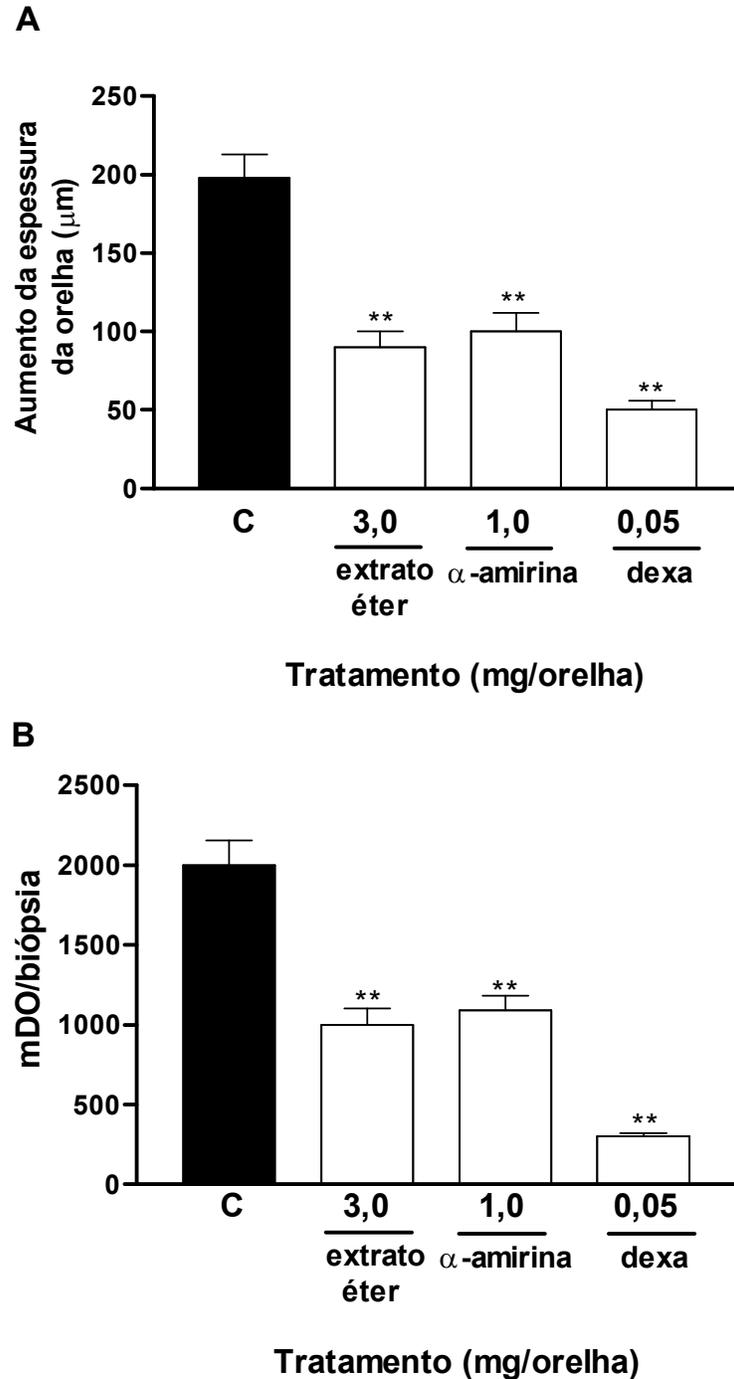


Figura 16. Efeito do extrato éter da *P. kleinii*, da α -amirina e dexametasona (dexta) administradas topicamente sobre o edema **(A)** e a atividade da enzima mieloperoxidase **(B)** de orelhas tratadas com oxazolona. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.9. Avaliação dos níveis da citocina IL-1 β

Quando o TPA é aplicado na orelha de camundongos ocorre aumento de vários mediadores pró-inflamatórios. Os níveis de IL-1 β apresentam um aumento máximo 6 h após e se mantém elevado até 24 h após a aplicação do TPA na orelha de camundongos (TOWBIN et al., 1995). O aumento tecidual da citocina IL-1 β foi reduzido de maneira dependente da dose pela aplicação tópica da α -amirina (0,1-1,0 mg/orelha) com inibição de $61 \pm 5\%$ e DI_{50} calculada de 0,53 (0,42- 0,73) mg/orelha (Figura 17).

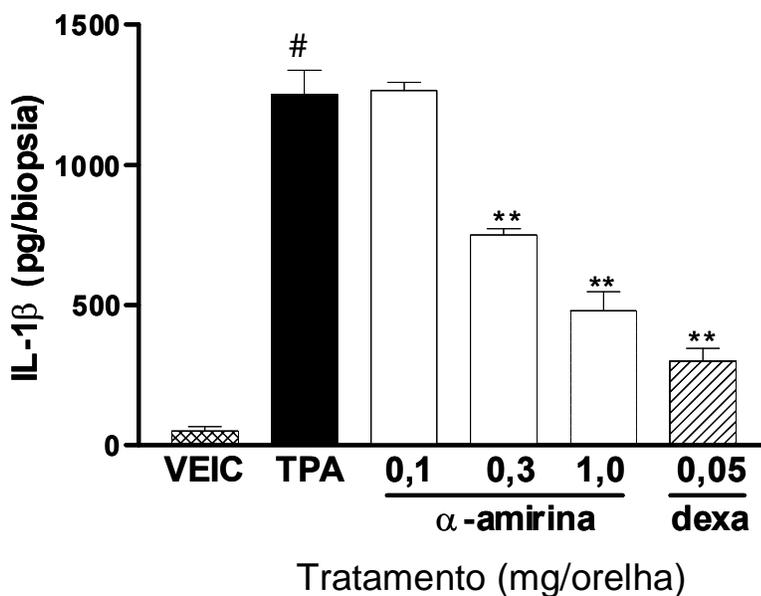


Figura 17. Efeito da α -amirina e da dexametasona (dexta) administrados topicamente nos níveis de IL-1 β após a aplicação do TPA. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significancia quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle (TPA), * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ ou veículo (VEIC), # $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student Newman Keuls).

4.10. Avaliação dos níveis de PGE₂

A aplicação tópica de TPA gera aumento significativo de PGE₂ nas orelhas de camundongos a partir de 1 h, e este aumento é máximo 6 h após a sua aplicação (INOUE et al., 1989). Da mesma forma que a dexametasona (0,05 mg/orelha), a administração tópica da α -amirina (0,1-1,0 mg/orelha) foi capaz de inibir de maneira proporcional a dose aplicada o aumento nos níveis teciduais de PGE₂, quando avaliado 6 h após a aplicação do TPA, com inibição de $66 \pm 7\%$ e DI₅₀ de 0,71 (0,68-0,90) mg/orelha (Figura 18).

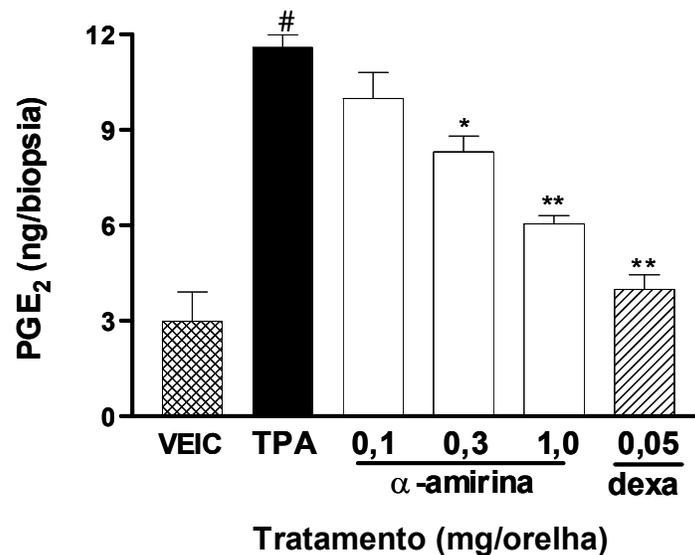


Figura 18. Efeito da α -amirina e dexametasona (dexta) administrados topicamente nos níveis de PGE₂ após a aplicação do TPA. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significancia quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle (TPA), *P<0,05 e **P<0,01 ou veículo (VEIC), #P<0,01 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student Newman Keuls).

4.11. Medida da atividade das enzimas COX-1 e COX-2

O triterpeno α -amirina (10-30 μ M) não foi capaz de alterar a atividade das enzimas COX-1 ou COX-2 *in vitro*. Confirmando os dados da literatura, o inibidor seletivo da COX-2 rofecoxib (10 μ M) reduziu em $97,5 \pm 0,5\%$ a atividade da COX-2, sem alterar de maneira significativa a atividade da COX-1. Por outro lado, o inibidor seletivo da COX-1 SC 560 (30 nM) inibiu em $81,5 \pm 0,5\%$ a atividade da COX-1, mas não da COX-2 (Figura 19).

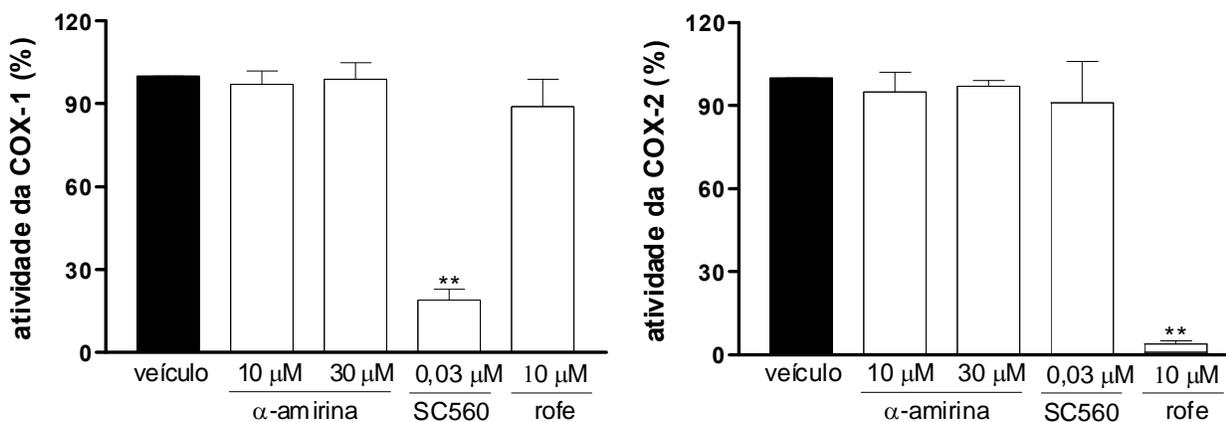
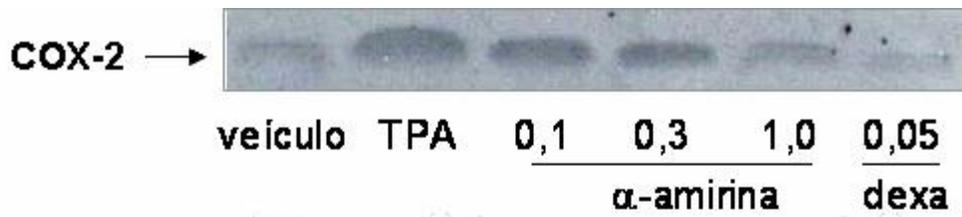


Figura 19. Efeito da α -amirina, SC560 e rofecoxib (rofe) na atividade das enzimas COX-1 e COX-2 em ensaio *in vitro*. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 1 experimento realizado em triplicata. Os asteriscos demonstram o nível de significancia quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, **P<0,01 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.12. Avaliação dos níveis da enzima COX-2 pelo ensaio de Western Blot

A aplicação tópica de TPA nas orelhas de camundongos aumenta de maneira significativa a expressão da enzima COX-2. Este aumento é máximo 6 h após a aplicação do TPA e se mantém elevado até 24 h (SANCHEZ e MORENO, 1999). A Figura 20 demonstra claramente que a α -amirina (0,1-1,0 mg/orelha) inibe significativamente o aumento da expressão da COX-2 de maneira proporcional à dose empregada e com eficácia semelhante ao controle positivo, a dexametasona (0,05 mg/orelha).

A



B

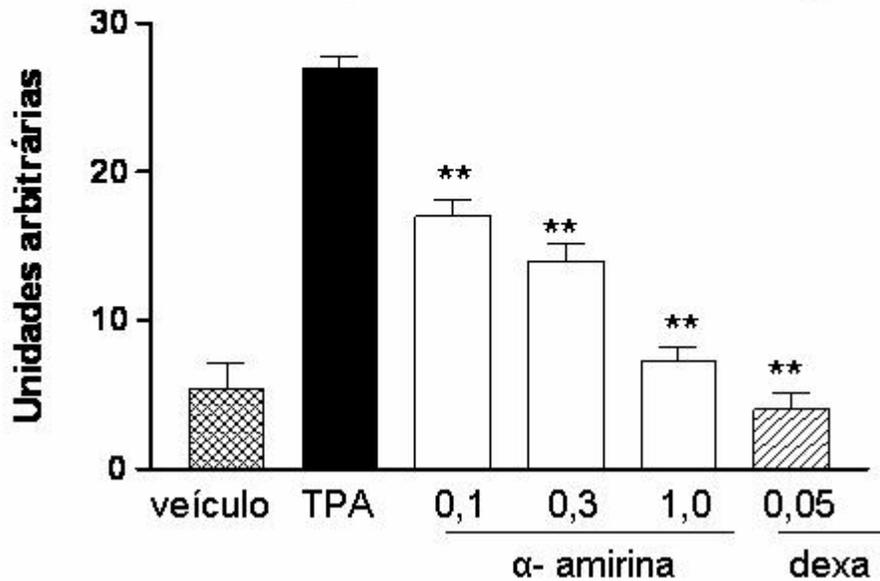


Figura 20. Efeito da α -amirina e da dexametasona (mg/orelha) sobre os níveis da enzima COX-2 (A) em orelhas de camundongos tratados com TPA. Análise densitométrica (B) das bandas imunorreativas. Resultados expressos em unidades arbitrárias e expressos como a média \pm E.P.M. de 3 experimentos distintos.

4.13. Avaliação da ativação do fator de transcrição NF- κ B pelo ensaio da mobilidade por deslocamento em gel (EMSA)

A aplicação do TPA na pele de camundongo causa ativação de fatores de transcrição nucleares como o AP-1 e o NF- κ B. O aumento da ativação do fator NF- κ B pode ser detectado 10 min e com seu nível máximo 30 min após a aplicação do TPA (CHUN et al., 2003). A Figura 21 demonstra que a α -amirina (0,1-1,0 mg/orelha) foi capaz de inibir a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B causada pela aplicação tópica de TPA em orelhas de camundongos, com eficácia semelhante ao controle positivo dexametasona (0,05 mg/orelha).

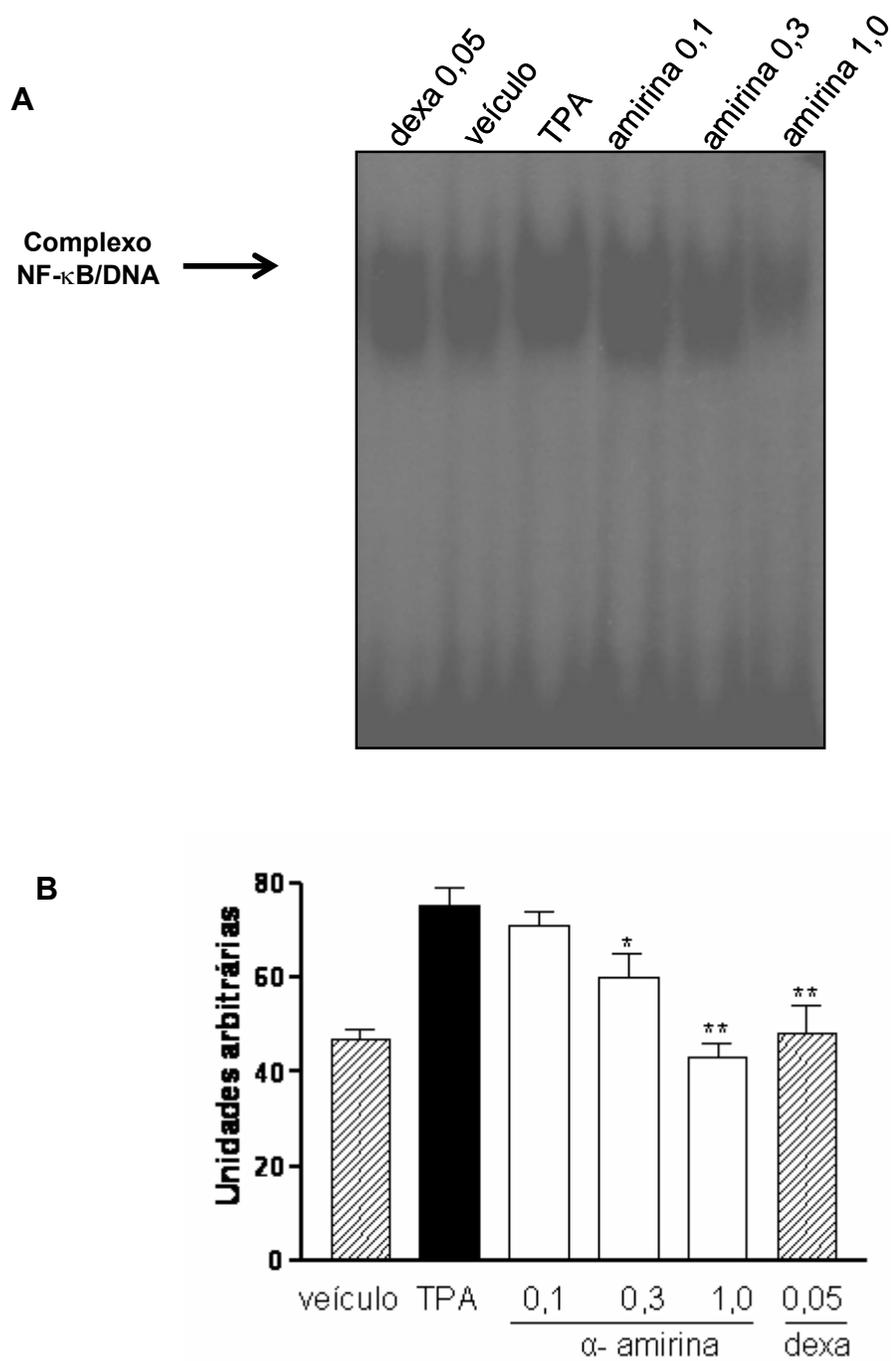


Figura 21. Efeito da α -amirina e dexametasona (mg/orelha) na formação do complexo NF- κ B/DNA nuclear pelo ensaio de EMSA em orelhas de camundongos tratados com TPA (**A**). Resultados expressos em unidades arbitrárias (**B**) e expressos como a média \pm E.P.M. de 3 experimentos distintos.

4.14. Avaliação dos níveis das MAPKs pelo ensaio de Western Blot

Com objetivo de avaliar o efeito da α -amirina sobre a fosforilação das MAPKs, foi realizado o ensaio de *western blot* para as formas fosforiladas (forma ativada) destas enzimas (Figuras 22-24). A aplicação do TPA na pele de camundongo causa ativação de proteínas quinases como as MAPKs. O aumento da ativação das MAPKs JNK, p38 e ERK pode ser detectado com seu nível máximo 30 min após a aplicação do TPA (KIM et al., 2003). A administração tópica da α -amirina (0,1-1,0 mg/orelha) ou da dexametasona não foi capaz de inibir a fosforilação das enzimas JNK (Figura 22), p38 (Figura 23) e ERK (Figura 24) causada pela aplicação de TPA em orelhas de camundongos.

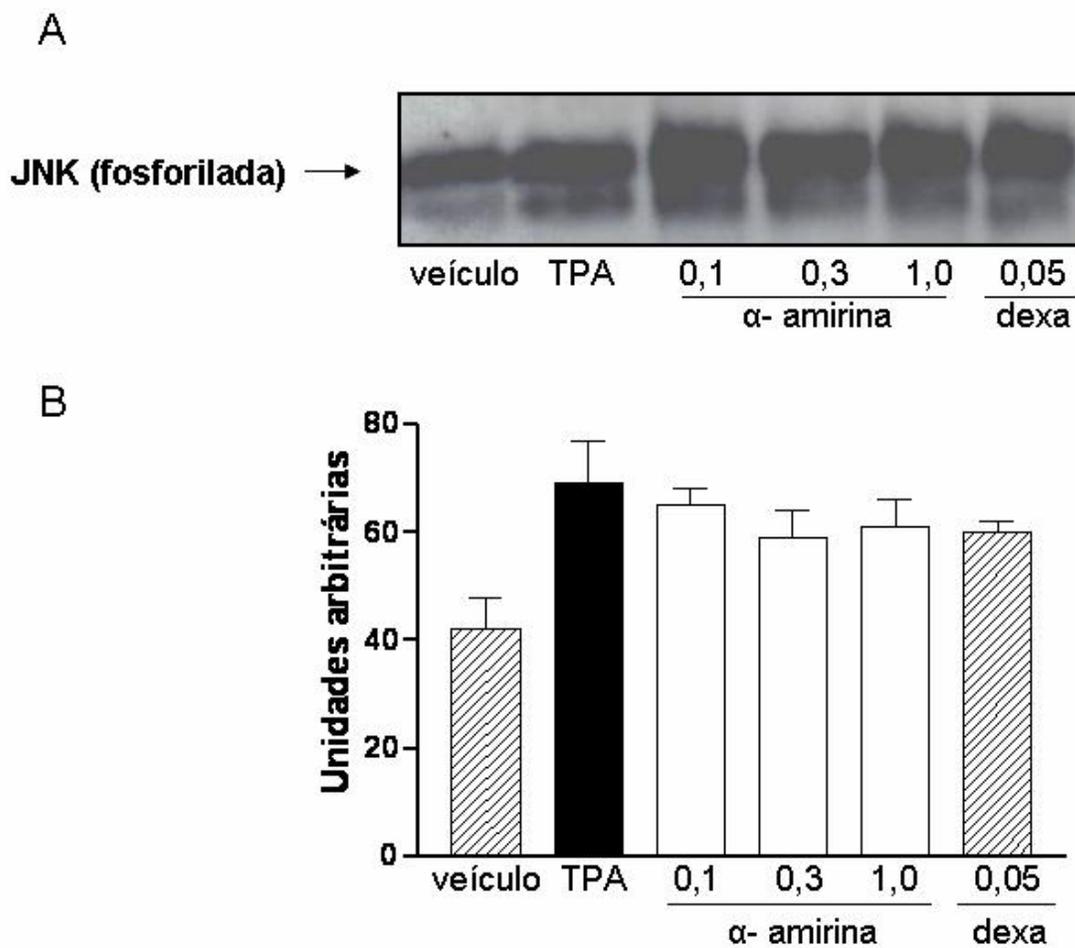
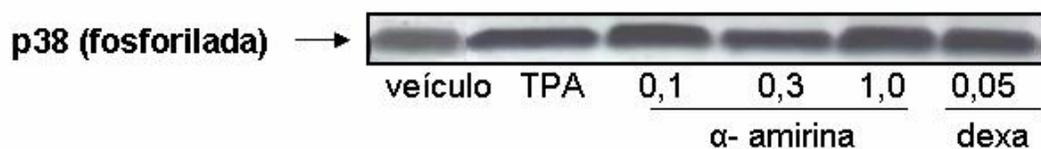


Figura 22. Efeito da α -amirina e da dexametasona (mg/orelha) sobre os níveis (A) da enzima JNK em orelhas de camundongos tratados com TPA. Análise densitométrica (B) das bandas imunorreativas. Resultados expressos em unidades arbitrárias e expressos como a média \pm E.P.M. de 3 experimentos distintos.

A



B

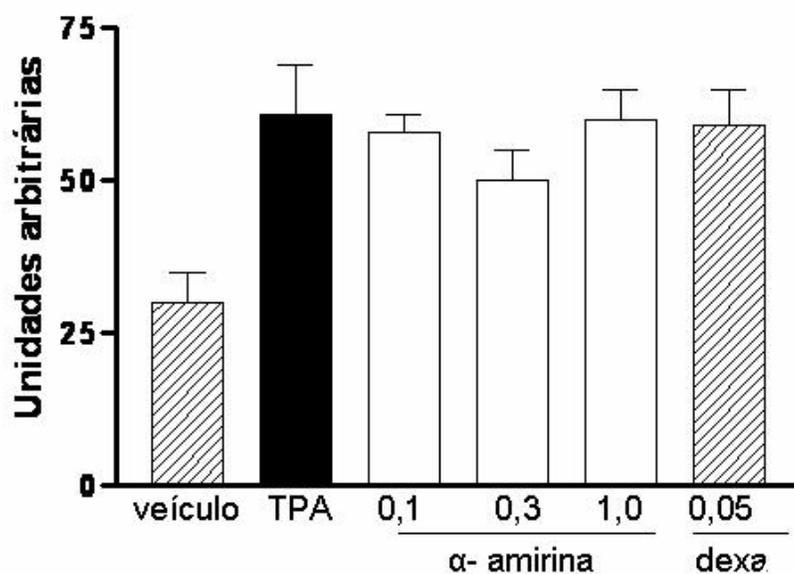


Figura 23. Efeito da α -amirina e da dexametasona (mg/orelha) sobre os níveis (A) da enzima p38 em orelhas de camundongos tratados com TPA. Análise densitométrica (B) das bandas imunorreativas. Resultados expressos em unidades arbitrárias e expressos como a média \pm E.P.M. de 3 experimentos distintos.

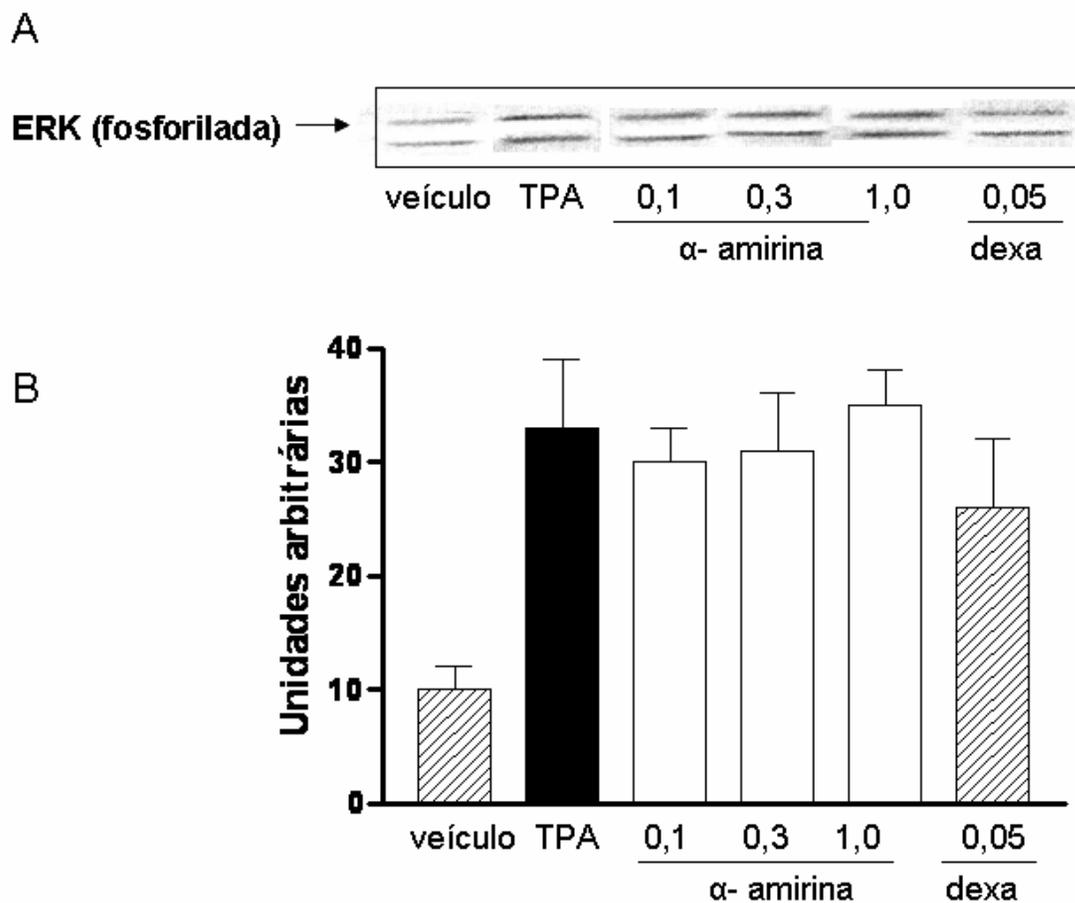


Figura 24. Efeito da α -amirina e da dexametasona (mg/orelha) sobre os níveis **(A)** da enzima ERK em orelhas de camundongos tratados com TPA. Análise densiométrica **(B)** das bandas imunorreativas. Resultados expressos em unidades arbitrarias e expressos como a média \pm E.P.M. de 3 experimentos distintos.

4.15. Edema de orelha mediado pela aplicação múltipla de TPA

A aplicação repetida de TPA em orelhas de camundongos causa resposta inflamatória crônica caracterizada por edema, infiltração predominante de células mononucleares e hiperproliferação celular na epiderme (STANLEY et al., 1991). A Figura 25 demonstra que após o estabelecimento do processo inflamatório crônico por aplicação repetida de TPA, a α -amirina e a dexametasona (aplicadas cronicamente) foram capazes de inibir o edema e a atividade da mieloperoxidase (indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares) causada pela aplicação múltipla de TPA. Ao contrário da α -amirina, o glicocorticóide não foi capaz de impedir a migração de leucócitos mononucleares para o sítio inflamado (Figura 25).

A infiltração de linfócitos é característica deste modelo de inflamação cutânea assim como patologias inflamatórias crônicas como a psoríase. A Figura 26 demonstra que após a aplicação crônica de TPA ocorre intensa infiltração de linfócitos na derme. O número de linfócitos no grupo tratado apenas com veículo (acetona) aumentou de $12,1 \pm 1,3$ para $60,2 \pm 2,3/\text{mm}^2$ no grupo que recebeu aplicações repetidas de TPA. Assim como a diminuição da migração de outros tipos celulares causada pela aplicação de TPA, a α -amirina (1mg/orelha) e a dexametasona (0,05 mg/orelha) foram capazes de diminuir significativamente a migração de linfócitos para a derme com $22,8 \pm 3,0$ e $18,3 \pm 1,9/\text{mm}^2$ respectivamente.

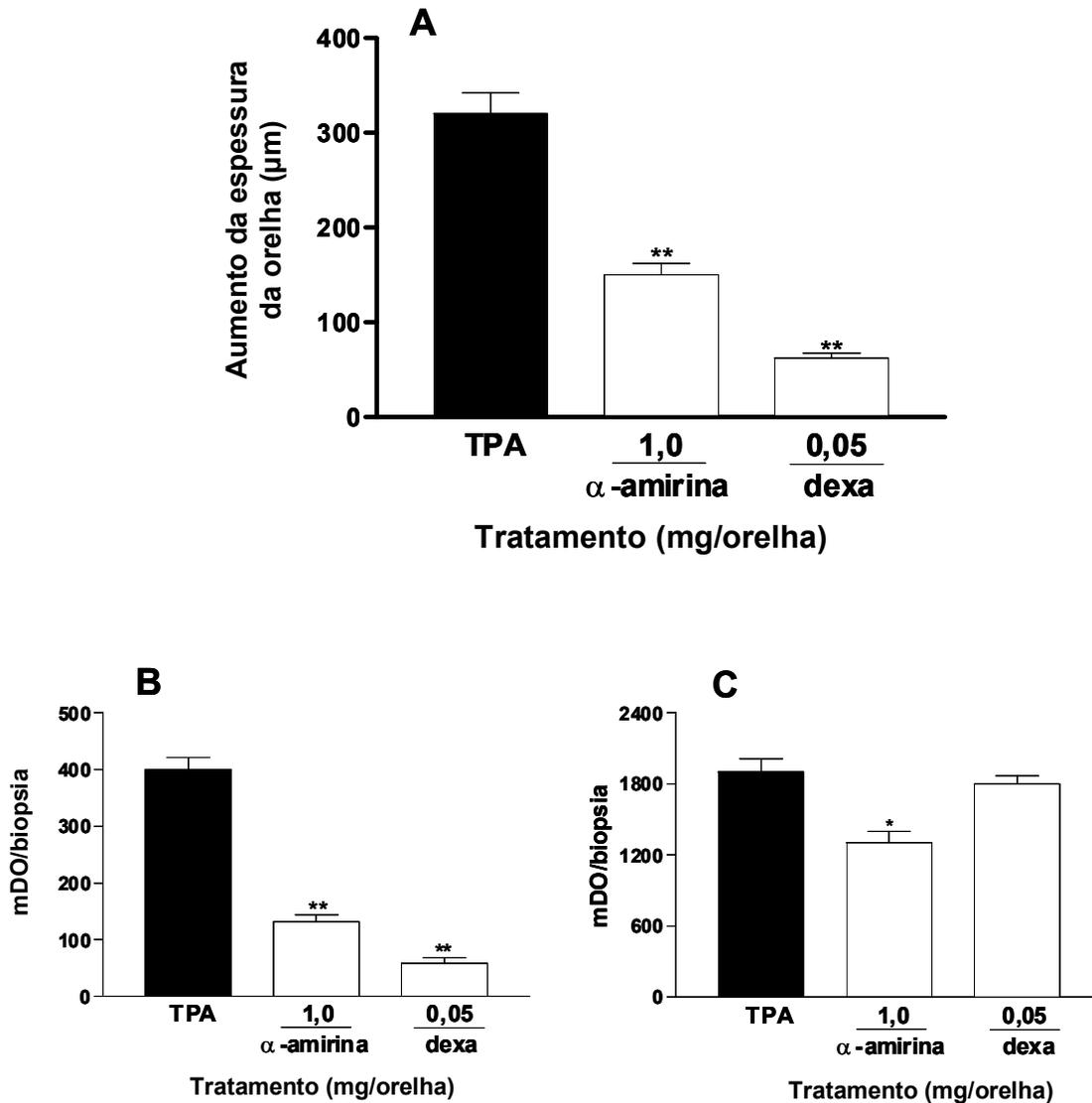


Figura 25. Efeito da α -amirina e da dexametasona (dexa) administrados topicamente no edema de orelha induzido pelo TPA (**A**) e na atividade das enzimas mieloperoxidase (**B**) e N-acetil- β -D-glucosaminidase (**C**) de homogenatos de orelhas tratadas com TPA. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 5-7 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

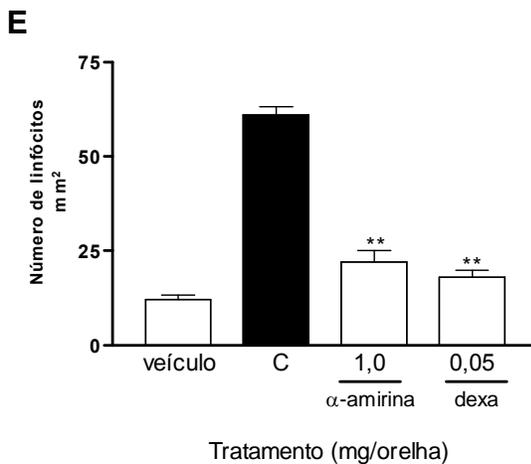
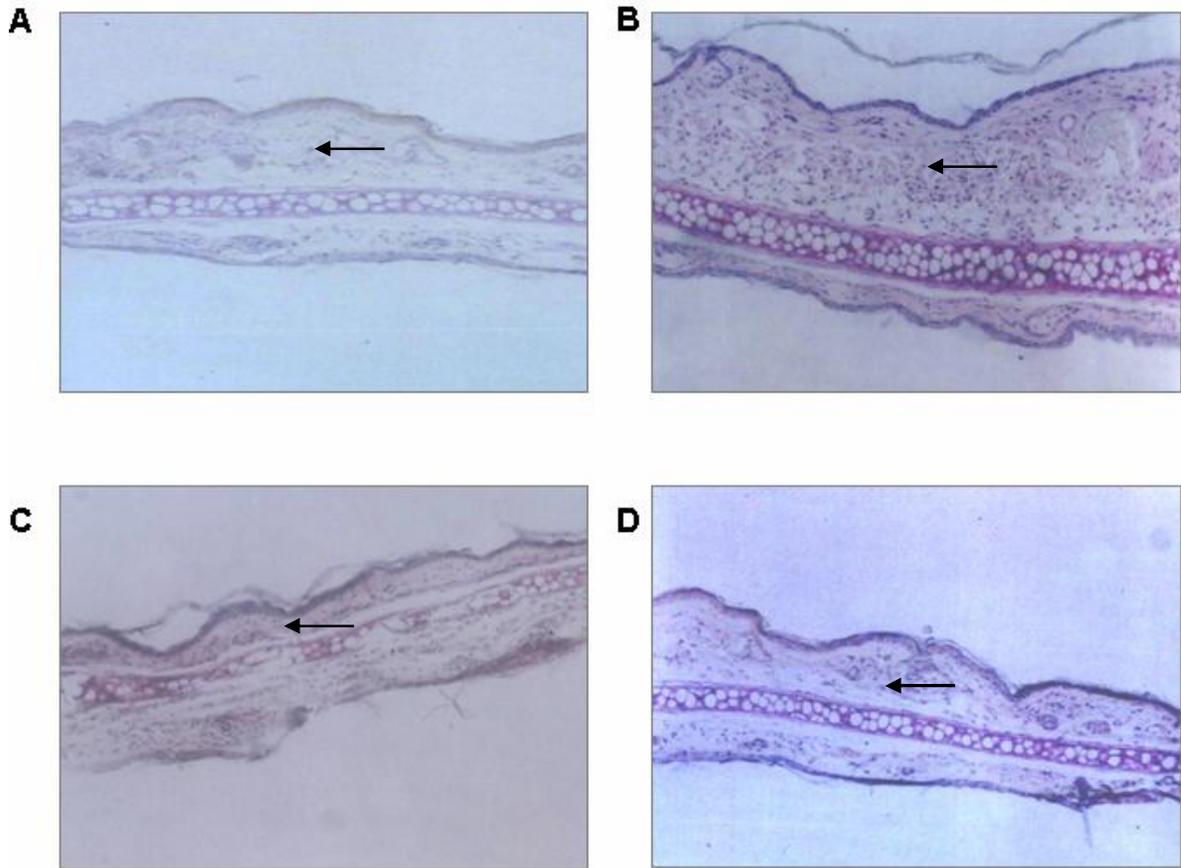


Figura 26. Cortes verticais de orelhas de camundongos coradas com PAS (aumento de 200x) coletadas após aplicação repetida de TPA. **(A)** veículo, **(B)** controle TPA, **(C)** α -amirina (1 mg/orelha) e **(D)** dexametasona (0,05 mg/orelha). Número de linfócitos/mm² **(E)**. A contagem de células foi realizada em 3 cortes de orelhas distintas sendo 3 campos por lâmina. As flechas indicam linfócitos na derme. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, **P<0,01 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

A aplicação repetida de TPA na orelha de camundongos gera um significativo aumento da espessura da epiderme, causado pela hiperproliferação dos queratinócitos (tipo celular mais abundante nesta camada da pele). Com a aplicação repetida de TPA a epiderme tem um aumento em sua espessura de 3,5 x em relação ao grupo de camundongos que recebeu apenas veículo (acetona) ($12,2 \pm 2,9 \mu\text{m}$ para o grupo que recebeu veículo e $42,0 \pm 7,1 \mu\text{m}$ para o grupo que recebeu TPA). A aplicação tópica da α -amirina (1mg/orelha) ou da dexametasona (0,05 mg/orelha) foi capaz de prevenir o aumento da espessura da epiderme com $19,2 \pm 5,1$ e $15,5 \pm 3,3 \mu\text{m}$, respectivamente (Figura 27 e 28).

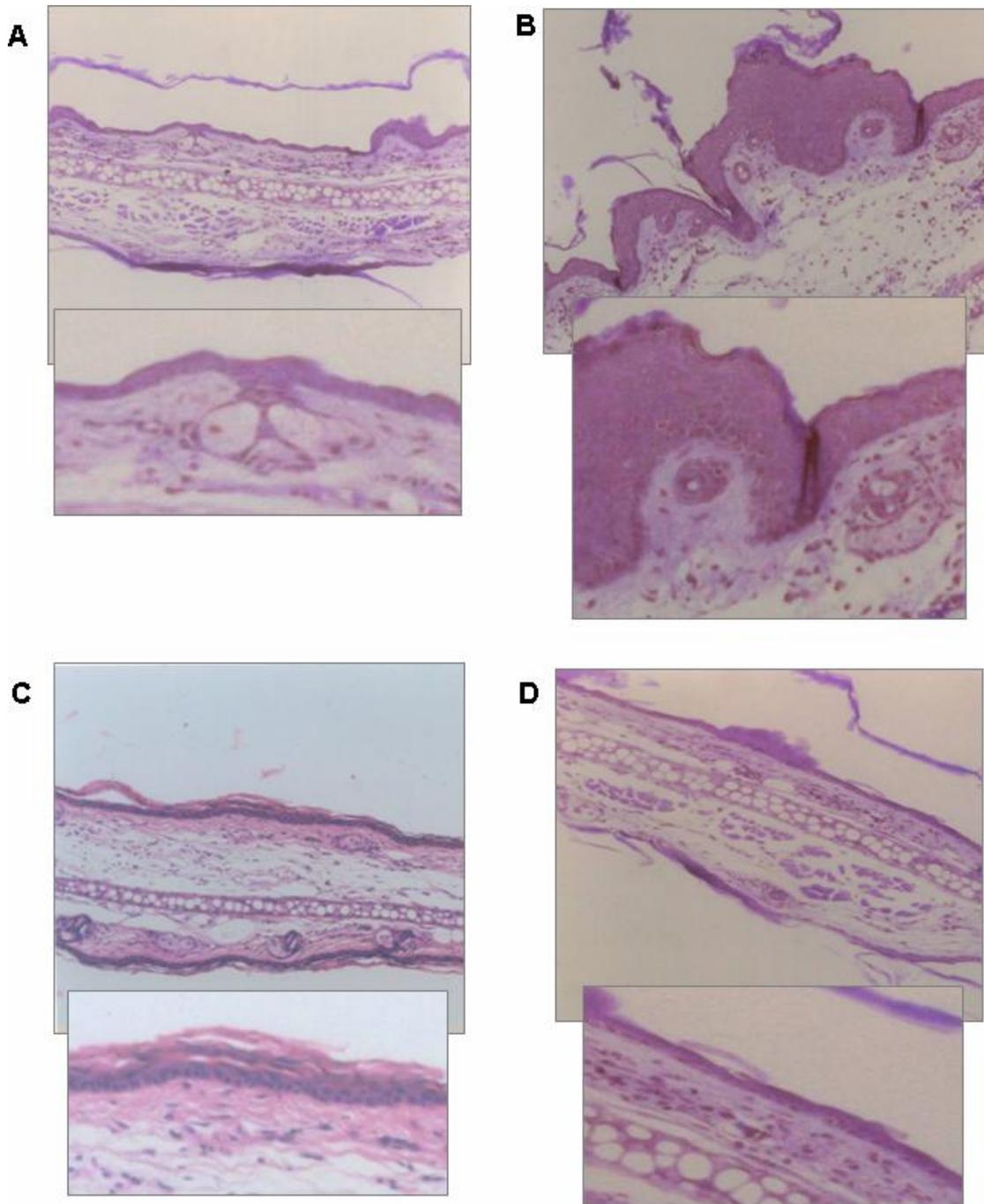


Figura 27. Cortes verticais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina coletadas após aplicação repetida de TPA. Aumento de 200x, em detalhe aumento de 400x. **(A)** veículo, **(B)** controle TPA, **(C)** α -amirina (1 mg/orelha) e **(D)** dexametasona (0,05 mg/orelha).

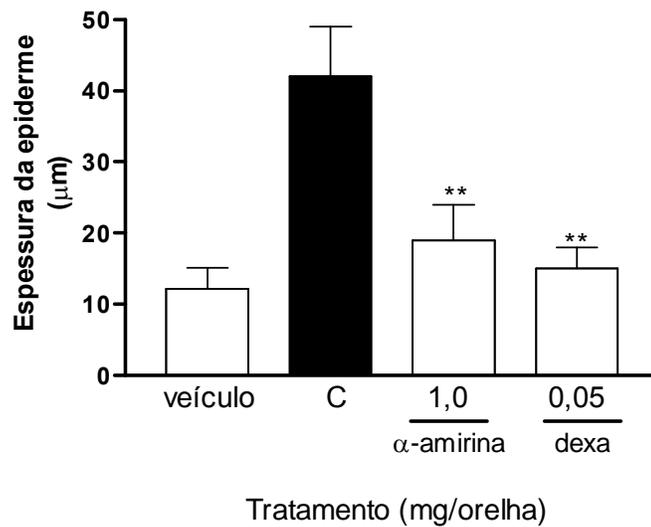


Figura 28. Espessura da epiderme (μm) após aplicação repetida de TPA. A avaliação da espessura da orelha foi realizada com objetiva graduada em 3 cortes de orelhas distintas sendo 3 medidas por lâmina. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, $**P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

4.16. Ensaio de união específica para a [³H]-dexametasona em pulmão de ratos

A Figura 29 demonstra que a α -amirina (30 μ M) não foi capaz de interferir com a união específica da [³H]-dexametasona em pulmão de ratos. Ao contrário o glicocorticoide dexametasona (0,1 –10 μ M), causou inibição significativa (78 \pm 6%) no sítio de ligação da [³H]-dexametasona.

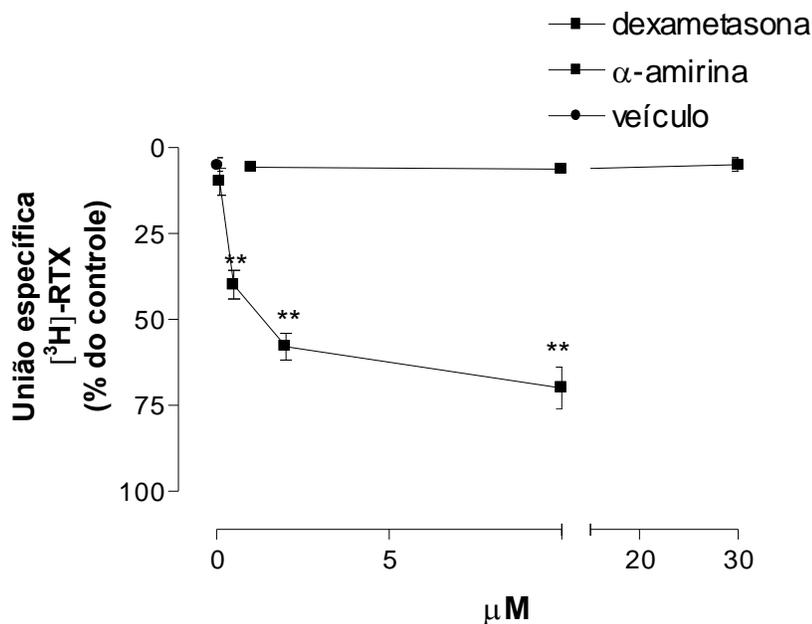


Figura 29. Efeito da α -amirina e dexametasona no ensaio de união específica da [³H]-dexametasona em pulmão de ratos. Cada ponto representa a média \pm E.P.M de três experimentos realizados em triplicata. ** $P < 0,01$ difere significativamente do controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnetts).

4.17. Avaliação da irritação primária e fotossensibilização cutânea em camundongos

Conforme demonstra a Tabela 3, ao contrário do Lauril éter sulfato de sódio, utilizado como controle positivo, o α -amirina (1 mg/orelha) não apresenta potencial irritante (até 72 horas após a aplicação) quando aplicado uma única vez na pele de camundongos. Da mesma maneira a aplicação repetida do α -amirina por 10 dias não foi capaz de provocar edema e/ou eritema na pele de camundongos (dados não demonstrados).

Tabela 3. Avaliação do potencial irritante do α -amirina

	24 h		48 h		72 h	
	edema	eritema	edema	eritema	edema	eritema
α -amirina	ns	grau 0	ns	grau 0	ns	grau 0
Lauril	*	grau 1	**	grau 2	**	grau 2

ns, não significativo; Lauril, Lauril éter sulfato de sódio. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, *P<0,05 e **P<0,01 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

A exposição da pele tratada com α -amirina (1 mg/orelha) à radiação ultravioleta não gerou edema e/ou eritema, demonstrando que esta substância não apresenta ou apresenta baixo potencial fotossensibilizante. O psoraleno, utilizado como controle positivo, conhecido agente fotossensibilizante provocou resposta inflamatória característica desta substância (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação do potencial fotossensibilizante da α -amirina

	1 h		24 h		48 h	
	edema	eritema	edema	eritema	edema	eritema
α -amirina	ns	grau 0	ns	grau 0	ns	grau 0
psoraleno	ns	grau 1	*	grau 3	**	grau 3

ns, não significante. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

5. DISCUSSÃO

Embora tenham sido descritos na literatura estudos sobre outras espécies de plantas do gênero *Protium*, poucos estudos farmacológicos para a espécie *P. kleinii* foram realizados. A atividade antiinflamatória de outras plantas do gênero, como a *Protium heptaphyllum*, tem sido relatada. A administração sistêmica de *P. heptaphyllum* foi capaz de inibir o extravasamento plasmático e a migração de eosinófilos e células mononucleares no modelo de pleurisia induzida pelo LPS em camundongos (SIANI et al., 1999). Recentemente, Oliveira e colaboradores (2004a) demonstraram que a administração sistêmica da resina da *P. heptaphyllum* foi capaz de reduzir a resposta inflamatória no edema de pata induzido pela carragenina em ratos, bem como no extravasamento plasmático induzido pelo ácido acético em camundongos (OLIVEIRA et al, 2004). A atividade farmacológica da *P. kleinii* foi descrita pela primeira vez por Otuki e colaboradores (2001), oportunidade em que os autores demonstraram que a administração sistêmica do extrato éter da *P. kleinii* inibiu a resposta nociceptiva induzida por vários estímulos químicos incluindo a formalina, capsaicina e pela administração intratecal de glutamato. O presente estudo amplia estes dados, demonstrando que o extrato éter obtido da casca da *P. kleinii* é eficaz em diversos modelos animais de inflamação cutânea, reduzindo eventos como o edema e a migração celular. Confirmando dessa forma, a indicação popular desta planta para o tratamento de inflamações cutâneas (REITZ, 1981).

Na última década, diversos trabalhos demonstraram a ocorrência de compostos derivados de plantas que interferem de maneira direta ou indireta em alvos para o desenvolvimento de medicamentos antiinflamatórios como: metabólitos do ácido araquidônico, citocinas e fatores de transcrição nuclear (para revisão ver CALIXTO et al., 2003 e CALIXTO et al., 2004). Muitos modelos realizados *in vitro* são amplamente utilizados para avaliação da potencial ação antiinflamatória destes compostos, entretanto modelos *in vivo* oferecem vantagens adicionais. O modelo de edema de orelha é um método simples, sendo que o edema pode ser induzido por diversos estímulos, requer baixa quantidade de compostos (objeto de teste) e, acima de tudo, permite obter resultados rápidos e reprodutíveis. Quando o interesse é o desenvolvimento de medicamentos para uso tópico estas vantagens são ainda maiores, visto que compostos com baixa absorção na pele são identificados rapidamente. Sendo assim, esse modelo constitui um método importante para a investigação de novos medicamentos para patologias inflamatórias que acometem a pele (BOUCLIER et al., 1990; VANE, 2000).

Tanto o extrato éter como a α -amirina falharam em prevenir os edemas de orelha induzidos pela aplicação de capsaicina ou de ácido araquidônico. De fato, diversos outros triterpenos pentacíclicos com estrutura semelhante à α -amirina, como o lupeol e o ácido ursólico também foram inativos em inibir significativamente estes modelos de inflamação cutânea (HUGUET et al, 2000).

Quando aplicada topicamente a capsaicina, substância responsável pela pungência das pimentas, observa-se resposta inflamatória neurogênica imediata

caracterizada por forte extravasamento plasmático e conseqüente formação de edema. O estudo do mecanismo de ação das respostas mediadas pela capsaicina neste modelo demonstra grande diferença quando comparado com o edema de orelha causado pelo TPA ou pelo ácido araquidônico. Diferentemente destes modelos, a capsaicina, através da excitação de neurônios sensoriais da pele, libera neuropeptídeos, como o CGRP, substância P, neurocinina A, VIP e monoaminas como a histamina e serotonina, que parecem ser os responsáveis pelo extravasamento plasmático causado por esta substância (BOUCLIER et al., 1990; GABOR e RAZGA, 1992; INOUE, et al., 1993; SANCHEZ e MORENO, 1999; KWAK et al., 2002; SHOLZEN et al., 2003).

A capsaicina causa excitação de neurônios sensoriais da pele através da ligação em um grupo de receptores acoplados a um canal iônico, denominados vanilóides (CATARINA E JULIUS, 2001). Inoue e colaboradores (1993) demonstraram que a aplicação tópica de vermelho de rutênio (bloqueador não seletivo de receptores vanilóides) foi capaz de inibir o edema de orelha mediado pela capsaicina. Através do ensaio de união específica de resiniferotoxina (um agonista de receptores vanilóides), confirmamos a falta de afinidade da α -amirina pelo receptor vanilóide, fato já evidenciado quando avaliamos seus efeitos no modelo de edema de orelha mediado pela capsaicina. Neste ensaio, diferente da capsaicina, a α -amirina não foi capaz de impedir a ligação da resiniferotoxina em seus respectivos receptores.

Pela primeira vez, Young e colaboradores (1983) observaram que a aplicação tópica de ácido araquidônico gera uma resposta inflamatória rápida,

caracterizada por intenso eritema e edema. Diferentemente da aplicação tópica de TPA, o ácido araquidônico causa pequeno acúmulo de neutrófilos. Os três principais mediadores deste processo inflamatório são os metabólitos do ácido araquidônico PGE₂ e os leucotrienos C₄ e D₄ (LTC₄/LTD₄) (CHANG et al., 1986). Por muitos anos o modelo de edema de orelha mediado pelo ácido araquidônico foi utilizado como método para avaliação de inibidores da atividade da enzima lipoxigenase *in vivo*. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que não só inibidores das enzimas COX/LOX são sensíveis a este modelo: inibidores das enzimas fosfolipase A₂, COX-1 e moduladores das respostas da histamina e serotonina são capazes de reduzir a resposta inflamatória gerada pelo ácido araquidônico (CHANG et al., 1985; PIGNAT et al., 1986; SANCHEZ AND MORENO, 1999). GOULET e colaboradores (2004) comprovaram esta hipótese, submetendo camundongos transgênicos que não apresentam as enzimas 5-LOX, COX-1 ou COX-2 ao modelo de edema de orelha mediado pelo ácido araquidônico. Camundongos com deleção gênica das enzimas 5-LOX e COX-1 apresentaram reduzida resposta inflamatória (edema e migração celular) causada pela aplicação tópica do ácido araquidônico. Ao contrário, a falta da enzima COX-2 não apresentou mudanças significativas no edema, migração celular e nos níveis teciduais da PGE₂. Ou seja, a α -amilina que é eficaz no modelo de edema de orelha mediado pelo TPA, mas não possui eficácia no modelo de edema mediado pelo ácido araquidônico, provavelmente não interfere na atividade das enzimas 5-LOX e/ou COX-1 ou nos receptores para prostaglandina E₂ ou para os leucotrienos C₄ e D₄. Realmente os resultados

obtidos neste estudo demonstraram que a α -amirina não interferiu na atividade da enzima COX-1 em experimentos realizados *in vitro*. Da mesma forma, estudos demonstraram que a α -amirina assim como seu isômero β -amirina não são capazes de interferir na atividade da enzima 5-LOX em experimentos realizados em neutrófilos de humanos (KWEIFIO-OKAI e MACRIDES, 1992; KWEIFIO-OKAI et al., 1994).

O modelo de edema de orelha induzido pelo TPA é um dos mais difundidos métodos para avaliação de processos inflamatórios e de drogas potencialmente úteis para tratar doenças da pele. A aplicação tópica de TPA promove indução de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular. O mecanismo pelo qual o TPA causa inflamação não está ainda completamente esclarecido, mas a liberação de metabólitos derivados do ácido araquidônico é determinante para origem deste processo. É atualmente bem aceito que a aplicação do TPA ativa diversas isoformas da proteína quinase C, que por sua vez ativam outros grupos de enzimas como as fosfolipases e MAP quinases. A ativação da fosfolipase A₂ citossólica induz a liberação de ácido araquidônico e conseqüentemente a produção de prostaglandinas (principalmente PGE₂) e leucotrienos (principalmente LTB₄) pela ação das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase, respectivamente. A ativação das MAP quinases por sua vez, induz a ativação de fatores de transcrição nuclear como o NF- κ B e o AP-1, os quais regulam a produção de diversas proteínas pró-inflamatórias (THORBURN et al., 1995; SANCHEZ e MORENO,

1999; CHUN et al., 2003; KWAK et al., 2002; SHOLZEN et al., 2003; KIM et al., 2003).

A aplicação tópica do extrato éter e do triterpeno α -amirina obtidos da *P. kleinii* inibiu de maneira dependente da dose dois importantes eventos associados ao processo inflamatório na pele: o edema e a migração de leucócitos polimorfonucleares para o sítio inflamado. A análise histológica de biópsias de orelhas dos camundongos confirmou de maneira qualitativa, a diminuição da migração de leucócitos polimorfonucleares e do edema causado pela aplicação tópica do extrato éter e da α -amirina.

Os neutrófilos são reconhecidamente um dos componentes centrais do processo inflamatório, principalmente em sua fase inicial. Estas células migraram para o sítio inflamado e liberam várias substâncias incluindo entre outros as enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio, proteínas catiônicas e outros mediadores pró-inflamatórios. Além disso, este efeito tem significado clínico importante tendo em vista que o aumento da presença de neutrófilos na pele tem grande relação com patologias inflamatórias cutâneas como os diversos tipos de dermatites e infecções piogênicas. Nestas patologias a quantidade de neutrófilos na pele pode ser relacionada diretamente com a intensidade da patologia (KATZ e STROBER et al., 1978; BRADLEY et al., 1982; SCHAERLI et al., 2004).

Além da α -amirina, os compostos breína, 3-oxo-11-16-di-hidroxi-ursa-12-eno, 3-ceto-11-hidroxi-ursa-eno e 3-oxo-11-hidroxi-ursa-12-eno parecem participar, pelo menos em parte, da atividade antiinflamatória do extrato éter no

edema de orelha mediado pelo TPA. Este fato pode explicar a semelhante eficácia e também as potências observados para o extrato de éter e um de seus componentes o triterpeno pentacíclico α -amirina neste modelo. Sugerindo que o estudo da atividade da antiinflamatória do extrato éter desta planta parece ser promissor, principalmente pela grande possibilidade de isolamento de novos compostos antiinflamatórios.

Os triterpenos amirínicos (amirina e seus derivados) são reconhecidamente ativos por possuírem atividade antiinflamatória em modelos de inflamação tópica e artrite (AKIHISA et al., 1996; RECIO et al., 1995; KWEIFIO-OKAI et al., 1994). Além de apresentarem atividade gastroprotetora e anti-pruriginosa, demonstradas recentemente (OLIVEIRA et al., 2004b; OLIVEIRA et al., 2005c). Assim, os resultados do presente estudo confirmam e estendem os dados existentes na literatura sobre o efeito antiedematogênico da α -amirina (RECIO et al., 1995; DELLA LOGIA et al., 1994). Além disso, nossos resultados avançam substancialmente a respeito do provável mecanismo pelos quais esses compostos exercem seus efeitos antiinflamatórios.

A atividade antiinflamatória do triterpeno α -amirina parece estar relacionada, pelo menos em parte, com sua capacidade de diminuir os níveis da PGE_2 na pele de camundongos. O aumento dos níveis da PGE_2 na pele é detectado 1h após a aplicação do TPA nas orelhas de camundongos e apresenta o mesmo decurso temporal da formação do edema, sendo considerado o principal responsável pela formação deste (INOUE, 1989). A aplicação intradérmica de PGE_2 em humanos ou em animais causa eritema

intenso e formação de edema. Além disso, esta prostaglandina pode amplificar mudanças de permeabilidade vascular causada por outros mediadores como os neuropeptídeos e leucotrienos (FOGH e KRAGBALLE, 2000).

As enzimas conhecidas como cicloxigenases (COX-1 e COX-2), são as responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e têm importante função nas respostas inflamatórias. Ao contrário da forma constitutiva COX-1, a COX-2 é geralmente induzida em resposta a estímulos como fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, lesão tecidual e radiação ultravioleta (CUNNINGHAM, 1990; FOGH e KRAGBALLE, 2000; TILLEY et al., 2001). A retirada do gene responsável pela produção da COX-2 é capaz de reduzir as respostas inflamatórias em modelos animais de inflamação cutânea, indicando esta enzima como um potencial alvo para o tratamento de patologias inflamatórias que acometem a pele (TILLEY et al., 2001; MULLER-DECKER et al., 2002).

Conforme os resultados deste trabalho, a redução dos níveis de PGE₂ causada pela α -amirina não parece estar relacionada com a inibição da atividade da enzima COX-1 bem como da enzima COX-2. Ao contrário, a exemplo da dexametasona, a α -amirina foi ativa em inibir a expressão da forma induzida desta enzima. Esse parece ser um dos mecanismos importantes envolvidos nas ações antiinflamatórias tópicas da α -amirina em camundongos.

Após um estímulo nocivo, diversos tipos celulares presentes na pele produzem e/ou liberam citocinas pro-inflamatórias. A citocina IL-1 β , por exemplo, pode iniciar processo inflamatório cutâneo independente de antígeno

(DEBENEDICTIS et al., 2001). Células dendríticas, melanócitos, fibroblastos e leucócitos são conhecidos como fontes de IL-1 β na pele (GRÖNE, 2002). A citocina IL-1 β é responsável pela indução de moléculas de adesão, outras citocinas, cicloxigenases entre outras proteínas pró-inflamatórias (MURPHY et al, 2000). O fato de o extrato éter da *P. kleinii* e da α -amirina reduzirem o edema causado pelo zimosan, conhecido por induzir processo inflamatório mediado pela liberação de IL-1 β (EISENBERG et al., 1990; ROBERGE et al., 1991), corroboram com os dados que demonstram a redução dos níveis de IL-1 β em orelhas de camundongos pela administração da α -amirina.

A indução de mais de 90 genes são relacionados com a ação da IL-1 β em células como queratinócitos e fibroblastos, dentre estes estão os genes que regulam a expressão da enzima COX-2 (BULL e DOWD, 1993; MURPHY et al., 2000). Este fato pode ser observado em experimentos onde a IL-1 β induz de maneira concentração dependente a liberação de PGE₂ em fibroblastos, o qual é bloqueado pelo inibidor de síntese protéica cicloheximida (RAZ et al., 1988). Esses dados sugerem que a inibição da expressão da enzima COX-2 e a consequente diminuição dos níveis da PGE₂ pode ser explicada pela diminuição dos níveis de IL-1 β causada pela α -amirina.

A importância da IL-1 β na resposta inflamatória faz dela um alvo promissor para o tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele. De fato, a inibição da síntese de citocinas como a IL-1 β é um dos mecanismos pelos quais os glicocorticóides exercem seus efeitos antiinflamatórios (TOWBIN et al., 1995). Além disso, anticorpos anti-IL-1 β ou antagonistas de receptores para esta

citocina, são utilizados na clínica ou estão em fase final de avaliação em ensaios clínicos para o tratamento da artrite reumatóide (GRASSEGER e HOPFL, 2004). Embora a utilização de peptídeos como medicamentos seja uma estratégia racional, visto a alta especificidade da resposta para o tratamento de diversas patologias, ela oferece algumas barreiras. Dentre estas desvantagens podemos destacar a alta incidência de efeitos colaterais como reações de hipersensibilidade e a baixa aderência devido à via de aplicação parenteral (GUPTA e SKINNER, 2004). A administração de medicamentos pela via percutânea oferece diversas vantagens, tais como: ausência de metabolismo hepático, liberação contínua do medicamento, menor incidência de efeitos indesejáveis, além da alta aderência ao tratamento (SOUTHWELL e BARRY, 1983). Entretanto, o maior obstáculo na administração epicutânea de medicamentos é a baixa absorção da maioria das substâncias testadas através da pele. Assim, a administração tópica de moléculas de baixo peso molecular, como a α -amirina, que interferem nas respostas inflamatórias relacionadas com citocinas parece ser promissora, pelo fato de a grande maioria de medicamentos com estratégia terapêutica anti-citocina serem peptídeos e assim necessitarem de administração por via endovenosa, intramuscular ou subcutânea (WILLIAMS e KUPPER, 1996; TROTTA et al., 2002).

Diversos estímulos podem induzir a ativação de fatores de transcrição nuclear como o NF- κ B. Dentre eles podemos citar: citocinas, infecção viral, radiação ultravioleta, entre outros. O aumento da ativação deste fator nuclear tem importante função no desenvolvimento e na manutenção de patologias

cutâneas, incluindo a psoríase, dermatite de contato, doenças autoimunes e carcinogênese (BELL et al., 2003).

A estimulação celular resulta na ativação do complexo de proteínas I κ B quinases (IKKs), composto por três unidades: IKK α , IKK β e IKK γ . Uma vez ativado o complexo IKK promove rápida fosforilação de resíduos de serina específicos na porção amino-terminal das proteínas I κ B. As proteínas I κ B fosforiladas são então ubiquitinadas e degradadas pelo proteasoma 26S. Assim, o NF- κ B livre pode migrar para o núcleo, se associar a regiões específicas do DNA e regular a transcrição de um grande número de genes. O fator de transcrição nuclear NF- κ B regula genes responsáveis pela expressão de diversas proteínas pró-inflamatórias como citocinas (IL-1 e TNF- α), quimiocinas (IL-8 e MIP-1 β), moléculas de adesão (ICAM, VCAM e E-selectina), enzimas (NOSi e COX-2) entre outras (ROTHWARF e KARIN, 1999; KARIN e BEN-NERIAH, 2000; PICKART, 2004) .

A ativação do NF- κ B no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA, ocorre poucos minutos após a aplicação do agente flogístico, sendo o principal responsável pela expressão de diversas proteínas pro-inflamatórias como a IL-1 β e a COX-2 (CHI et al., 2003). Estas proteínas são responsáveis pelo início e a manutenção das respostas inflamatórias neste modelo. Assim, a redução da ativação do fator NF- κ B pela α -amirina pode explicar a sua capacidade de diminuir os níveis de IL-1 β , bem como da expressão da enzima COX-2. Poucos triterpenos pentacíclicos têm sido descritos como inibidores da ativação do NF- κ B, dentre estes encontra-se o ácido ursólico. Este triterpeno pentacíclico com

estrutura semelhante a α -amirina é capaz de reduzir a ativação deste fator por inibir a enzima I κ B α quinase (SHISHODIA et al., 2003). Além disso, diversos estudos demonstram que o NF- κ B ou componentes deste sistema como as I κ B quinases estão envolvidos no desenvolvimento e diferenciação da epiderme (BELL et al., 2003). Este fato pode explicar a capacidade da α -amirina em inibir a hiperproliferação nas células da epiderme após a aplicação repetida do TPA em orelhas de camundongos.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que a ativação da via de sinalização das MAPKs regula a expressão gênica em nível transcricional. A ativação dessas proteínas por estímulos químicos como, por exemplo, o TPA, tem sido relacionada à ativação e/ou regulação direta de fatores de transcrição envolvidos na expressão de vários genes, dentre eles o NF- κ B (KARIN, 1995; KAMINSKA et al., 2000). Devido ao fato dos resultados do presente trabalho demonstrarem que a α -amirina não interfere na fosforilação das MAPKs p38, JNK e ERK podemos sugerir que este composto inibe o processo inflamatório em pontos mais inferiores das vias de sinalização celular como o já citado NF- κ B. De fato, diversos terpenos com atividade antiinflamatória incluindo o partenolídeo, helenanina e a oleandrina, são conhecidos por bloquearem este fator de transcrição interferindo na ativação do complexo de proteínas I κ B quinases e/ou impedindo a fosforilação de resíduos de serina específicos na porção amino-terminal das proteínas I κ B (BREMNER e HEINRICH, 2002; CALIXTO et al., 2003). Estudos estão sendo realizados a fim de comprovar esta hipótese.

Outro mecanismo da ação antiinflamatória da α -amirina pode ser a interferência desse composto em vias sensíveis a proteína quinase C (PKC), visto que estudos realizados *in vitro*, demonstraram que este composto parece ser capaz de reduzir, a atividade desta enzima (HASMEDA et al., 1999). Além disso, Otuki e colaboradores demonstraram recentemente (2005) que a administração sistêmica da α,β -amirina possui efeito antinociceptivo em vários modelos de nocicepção química tanto em ratos como em camundongos, incluindo a injeção intraplantar do TPA (um ativador da PKC) e do 8-Br-AMP_c (um ativador da PKA). Sugerindo que a atividade antinociceptiva da α,β -amirina está relacionada com vias sensíveis a proteína quinase C e proteína quinase A. Indicando também, que a α -amirina pode ter sua atividade antiinflamatória acompanhado de um efeito analgésico, dado importante visto que a dor é um sintoma freqüente em diversas patologias inflamatórias de pele (LEUNG et al., 2004).

A fim de avaliar a capacidade da α -amirina em reduzir a resposta inflamatória causada por estímulos que não o TPA, este composto foi submetido aos edemas de orelhas mediados pela oxazolona, fenol ou pelo zimosan. O fato da α -amirina prevenir a resposta inflamatória (edema e migração de polimorfofoculares) causada pela oxazolona demonstra que este composto não só é capaz de inibir a resposta inflamatória causada por uma irritação imediata (como no modelo de edema de orelha mediado pelo TPA) como uma resposta alérgica semelhante às dermatites observadas em humanos (FUJI et al., 2002). O modelo de edema de orelha induzido pelo fenol é um modelo animal de

dermatite de contato. Recentemente, Lim e colaboradores (2004) demonstraram que a aplicação tópica deste solvente induz o aumento do RNA mensageiro para proteínas inflamatórias como a IL-1 β , COX-2 e INF- γ . Estes resultados demonstram que a α -amirina é capaz de reduzir a resposta inflamatória causada por diferentes modelos animais de inflamação cutânea, embora as vias pró-inflamatórias envolvidos nestes modelos sejam semelhantes. Confirmando a capacidade da α -amirina interferir em pontos chaves do processo inflamatório, como a produção da citocina IL-1 β e do metabólito do ácido araquidônico PGE₂.

Embora o modelo de orelha mediado por aplicação única de TPA seja um bom ensaio para *screening* e estudo dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório de produtos naturais, ele também é capaz de gerar resultados falsos positivos e de pouca relevância clínica (STANLEY et al., 1991). Assim, fármacos que não possuem eficácia clínica em patologias inflamatórias cutâneas como o antiinflamatório não esteroide indometacina, podem inibir edema e migração neutrofílica causado pelo TPA (FUJII et al., 2002). Neste modelo, os sinais do processo inflamatório como edema, eritema e hiperplasia não estão envolvidos com populações celulares como macrófagos e linfócitos T. Os processos inflamatórios cutâneos crônicos têm como características a infiltração celular predominante de linfócitos T e macrófagos. Este último grupo de células exerce diversas funções biológicas incluindo o controle da resposta imune. Os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos além de liberarem diversos mediadores inflamatórios como os metabólitos do ácido araquidônico e citocinas (VALLEDOR e RICOTE et al., 2004). A liberação de fatores como a

MCP-1 (proteína quimiotática de monócito-1) pelo macrófago é responsável pela quimiotaxia de células T para a derme na psoríase (ROSS et al., 2000). Além da quimiotaxia, o fato de macrófagos interagirem diretamente com linfócitos T pode ser responsável pela manutenção do processo inflamatório local. Assim, impedir a migração ou inibir a atividade dos macrófagos parece ser uma estratégia relevante para o tratamento de inflamações cutâneas (THEPEN et al., 2000).

A redução da migração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos para o sítio da inflamação podem explicar a reversão do processo inflamatório crônico causado pela α -amirina. Esta reversão pode ocorrer pela diminuição de macrófagos no sítio inflamado e indiretamente pela diminuição da migração e ativação de linfócitos T. Embora esta hipótese necessite de comprovação, a população de linfócitos que α -amirina reduziu parece ser de linfócitos T, visto que Stanley e colaboradores (1991) demonstram no estudo da padronização do modelo de aplicação repetida de TPA ser este tipo celular predominante no mesmo tempo de avaliação histológica realizada em nosso estudo. O modelo de aplicação repetida de TPA se aproxima bastante das características presentes nas doenças inflamatórias cutâneas crônicas justamente pela intensa migração de macrófagos e linfócitos T (principalmente CD4⁺ e CD8⁺) (STANLEY et al, 1991). Outra característica deste modelo é a forma de tratamento dos compostos a serem testados, estes são administrados após o estabelecimento do processo inflamatório, se assemelhando ao tratamento clínico usual destes medicamentos.

O aparecimento de linfócitos T é um fator imprescindível para a função imune da pele e está envolvido na patogênese de diversas condições inflamatórias cutâneas como psoríase, além de vários tipos de dermatites, vitiligo, alopecia (BOEHNCKE e SCHON et al., 2003). Diversas terapias incluindo os imunossupressores (como as ciclosporinas) e medicamentos biológicos (como proteínas recombinantes) que tem como mecanismo diminuir respostas mediadas por linfócitos T, têm sido utilizadas para o tratamento de formas severas de psoríase. Um exemplo destas proteínas recombinantes é o *Efalizumab*[®], um anticorpo que interage com receptores CD11a, responsáveis pela migração das células T para o tecido e pela sua interação com queratinócitos (LEONARDI, 2003). Tanto os imunossupressores quanto as proteínas recombinantes têm mostrado eficácia em grande parte dos tratamentos em pacientes com psoríase, embora diversos efeitos colaterais como infecções oportunistas e alergias tenham sido relatados (KANITAKIS et al., 2003). Desta maneira, novos compostos, como a α -amirina, que interfiram nesta etapa do processo inflamatório necessitam ser avaliados clinicamente visando a confirmação de seus efeitos observados em animais.

Os glicocorticóides têm sido utilizados há mais de 50 anos para o tratamento de diversos tipos de dermatoses e atualmente a aplicação tópica deste grupo de medicamentos é considerada o tratamento mais efetivo e disseminado, sendo inclusive a primeira escolha para estas patologias. O aparecimento de taquifilaxia e a presença de importantes reações adversas dessas drogas (quando aplicado topicamente): atrofia da pele com conseqüente

diminuição da barreira física e aparecimento de estrias, ocorre com alta frequência sendo um grande problema para seu uso na clínica. Estes efeitos fazem com que grande parte dos tratamentos seja abandonado, temporária ou definitivamente (AHLUWALIA, 1998; MENDONÇA e BURDEN, 2003).

Existe uma semelhança entre os triterpenos pentacíclicos e glicocorticóides, tanto em sua estrutura química como também no perfil de ação em diversos modelos de inflamação (*in vivo* e *in vitro*). A hipótese de que estes compostos poderiam estar interagindo com receptores de glicocorticóides tem sido sugerida por diversos pesquisadores (RECIO et al., 1995). Entretanto, nossos resultados demonstram claramente que a α -amirina não foi capaz de alterar a ligação da dexametasona em seus respectivos receptores em ensaio de união específica. Obviamente não podemos descartar a possibilidade da α -amirina estar interagindo com receptores de glicocorticóides em sítios diferentes da dexametasona. Este dado torna ainda mais relevante o efeito antiinflamatório da α -amirina, visto que podemos estar diante de um composto com eficácia semelhante à dexametasona e ao mesmo tempo isento muitos de seus efeitos indesejáveis. Essa hipótese, contudo carece de mais fundamento experimental.

A importância do tratamento de patologias da pele como a psoríase, tem sido realçada não somente pela gravidade do processo inflamatório, mas, sobretudo pela relação destes com a oncogênese de diversos tipos celulares. Esta relação parece estar envolvida com o aumento da expressão da enzima COX-2. Assim, camundongos manipulados geneticamente para expressar de maneira excessiva a enzima COX-2 na epiderme, mostraram-se mais sensíveis

a carcinogênese causada por estímulos físicos e químicos (MULLER-DECKER et al., 2002). Além disso, a administração de celecoxib, um inibidor seletivo da atividade da enzima COX-2, foi capaz de prevenir a carcinogênese em pele de camundongos submetidos à radiação ultravioleta (TRIPP et al., 2003). Considerando o efeito inibitório da α -amirina frente à expressão da enzima COX-2, além dos outros efeitos observados no presente estudo, torna este composto potencialmente importante para estudo de sua possível propriedade quimiopreventiva. Recentemente, diversos compostos antiinflamatórios têm sido avaliados para a prevenção de diversos tipos de câncer. De fato, o triterpeno ácido ursólico induz apoptose em células de tumores e tem propriedades quimiopreventivas, por interferência na síntese de DNA, em células normais (KIM et al., 2000).

Se extrapolados, os resultados obtidos neste trabalho podem explicar os efeitos antiinflamatórios de outros triterpenos pentacíclicos, principalmente da classe dos ursanos como o ácido ursólico (RECIO et al., 1995; BARICEVIC et al., 2001; TAPONDJOU et al., 2003) e uvaol (RECIO et al., 1995; YASUKAWA et al., 1996) que possuem estrutura química muito semelhante a α -amirina. Além disso, muitas plantas como a *Himatanthus sucuuba*, *Sideritis taurica*, *Calendula officinalis* e *Achillea millefolium* (utilizadas em preparações cosméticas e em medicamentos) parecem ter seus efeitos antiinflamatórios (DELLA LOGGIA et al., 1994; AKIHISA et al. 1996; DE MIRANDA et al., 2000; ABOUTABL et al. 2002), pelo menos em parte, relacionados com a presença da α -amirina.

Devido a interessante atividade biológica destes compostos, novos estudos químicos devem ser conduzidos a fim de identificar novas substâncias antiinflamatórias, já que o gênero *Protium* é fonte de diversos triterpenos pentacíclicos.

Uma grande quantidade de novos compostos antiinflamatórios gerados pelos centros de pesquisas, universidades e empresas enfrentam um sério obstáculo para o uso em humanos: a necessidade de comprovação de sua segurança. Diversas plantas assim como compostos isolados destas apresentam potencial irritante e/ou fotossensibilizante. Um exemplo é psoraleno, uma cumarina encontrada em plantas das famílias Rutaceae e Moraceae e que apresenta alto potencial fotossensibilizante (WOOLF, 1999; ERNST, 2000). Além disso, substâncias de origem vegetal como os terpenos capsaicina e o 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) são conhecidas pelo seu potencial irritante e inclusive utilizadas como agentes flogísticos em modelos de inflamação cutânea (BOUCLIER et al., 1990). O teste de irritação cutânea causada pela aplicação múltipla da α -amirina indica que esta substância não apresenta potencial irritante com seu uso prolongado e que esta não é capaz de gerar uma resposta de hiperssensibilidade tardia. Assim, os testes preliminares de irritação e fotossensibilização demonstram que o uso tópico da α -amirina parece ser seguro.

Em resumo, os resultados do presente estudo demonstram que o triterpeno pentacíclico α -amirina pode interferir com diversas vias intracelulares envolvidas no processo inflamatório, conforme exemplificado no esquema da

Figura 30. Assim, a α -amirina ou compostos análogos poderiam constituir mais um candidato promissor para o desenvolvimento de um medicamento para tratar patologias relacionadas com a inflamação cutânea.

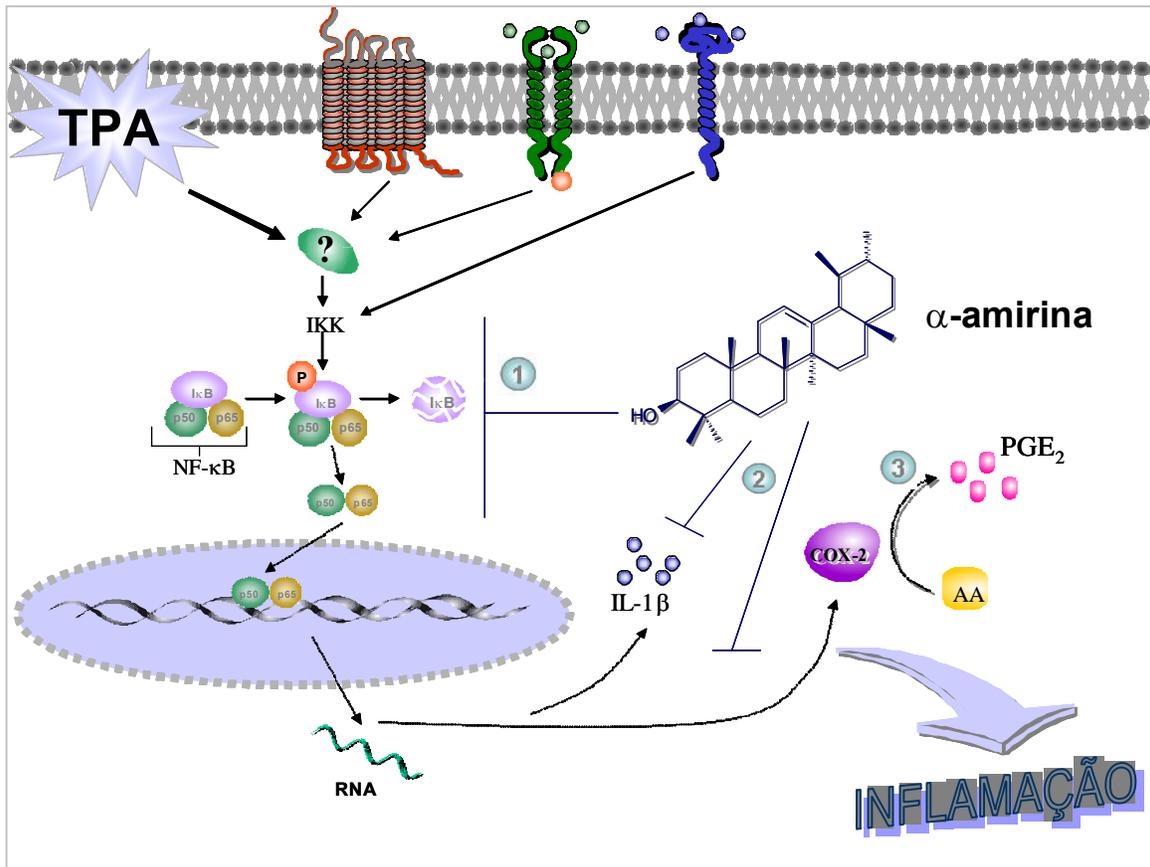


Figura 30. Esquema proposto para o efeito antiinflamatório da α -amirina. A aplicação tópica de TPA induz a ativação de fatores de transcrição nuclear. Esta ativação estimula a síntese de diversas proteínas envolvidas na resposta inflamatória observada (edema e migração celular) em modelos animais (KIM et al, 2003). Segundo os resultados obtidos nesse trabalho a α -amirina parece estar reduzindo o processo inflamatório por inibir a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (1), desta forma reduzindo a produção das proteínas IL-1 β e COX-2 (2). A redução da expressão da enzima COX-2 diminui a produção do metabólito do ácido araquidônico PGE₂ (3).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboutabl, E.A., Nassar, M.I, Elsakhawy, F.M., Maklad, Y.A, Osman, A.F, El-Khrisy., E.A. Phytochemical and pharmacological studies on *Sideritis taurica* Stephan ex Wild. J. Ethnopharmacol., 82: 177-184, 2002.
- Ahluwalia, A. Topical glucocorticoids and the skin-mechanisms of action: an update. Mediators Inflamm., 7: 183-193, 1998.
- Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H, Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K., Tamura, T. Triterpene alcohols from the flowers of *compositae* and their anti-inflammatory effects. Phytochemistry 43, 1255-1260, 1996.
- Api, A.M. Sensitization methodology and primary prevention of the research institute for fragrance materials. Dermatology, 205: 84-87, 2002.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Zupancic, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. J. Ethnopharmacol., 75: 125-132, 2001.
- Barry, B.W. Dermatological Formulations. Ed. Marcel Dekker, New York, 1983.
- Bell, S., Degitz, K., Quirling, M., Jilg, N., Page, S., Brand, K. Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease. Cell Signal., 15:1-7, 2003.
- Becker, P.F.L. Inflamação. In: Patologia Geral, Brasil: Sarvier, p.140-193, 1997.
- Bedi, M.K., Shenefelt, P.D. Herbal therapy in dermatology. Arch. Dermatol., 138: 232-242, 2002.
- Bhagwat, S.S., Manning, A.M., Hoekstra, M.F., Lewis, A. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. Drug Discov. Today, 4: 472-479, 1999.
- Bito, T., Roy, S., Sen, C.K., Shirakawa, T., Gotoh, A., Ueda, M., Ichihashi, M., Packer, L. Flavonoids differentially regulate IFN gamma-induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action. FEBS Lett., 520: 145-152, 2002.
- Blumenthal, R. The complete German Commission E monographs. American Botanical Council, New York, 2002.

- Bouclier, M., Cavey, D., Kail, N., Hensby, C. Experimental models in skin pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 42: 127-154, 1990.
- Boehncke, W.H., Schon, M.P. Interfering with leukocyte rolling--a promising therapeutic approach in inflammatory skin disorders? *Trends Pharmacol. Sci.*, 24: 49-52, 2003.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.*, 78: 206-209, 1982.
- Bremner, P., Heinrich, M. Natural products as target modulators of the nuclear factor-kB pathway. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54: 453-472, 2002.
- Brito, A.S. Irritação primária de pele. In: Manual de ensaios toxicológicos *in vivo*. Ed. Unicamp, Campinas, São Paulo, 1994.
- Bruneton, J. Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants. Ed. Lavoisier, Paris, 1993.
- Buckle, D.R., Hedgecock, C.J.R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. *Drug Discov. Today*, 2: 325-332, 1997.
- Bull, H.A., Dowd, P.M. Prostaglandins, Interleukins, and Cutaneous inflammation. *Immunomethods*, 2: 219-226, 1993.
- Caterina, M.J., Julius, D. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Ann. Rev. Neurosci.*, 24: 487-517, 2001.
- Calixto, J.B., Scheidt, C., Otuki, M.F., Santos, A.R.S. Biological Activity of plants extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 6: 261-279, 2001.
- Calixto, J.B., Otuki, M.F., Santos, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta Med.*, 69: 973-983, 2003.
- Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.*, 70: 93-103, 2004.
- Cauwenbergh, G. The role of the pharmaceutical industry in drug development in dermatology. *Clin. Dermatol.*, 20: 467-473, 2002.
- Chang, J., Blazek, E., Kreft, A.F., Lewis, A.J. Inhibition of platelet and neutrophil phospholipase A2 by hydroxyeicosatetraenoic acids (HETES). A novel

- pharmacological mechanism for regulating free fatty acid release. *Biochem. Pharmacol.*, 134:1571-1575, 1985.
- 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*, 10: 205-214, 1986.
- Chi, Y.S., Lim, H., Park, H., Kim, H.P. Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 1271-1278, 2003.
- Chuong, C.M., Nickoloff, B.J., Elias, P.M., Goldsmith, L.A., Macher, E., Maderson, P.A., Sundberg, J.P., Tagami, H., Plonka, P.M., Thestrup-Pederson, K., Bernard, B.A., Schroder, J.M., Dotto, P., Chang, C.M., Williams, M.L., Feingold, K.R., King, L.E., Kligman, A.M., Rees, J.L., Christophers, E. What is the 'true' function of skin? *Exp. Dermatol.*, 11: 159-187, 2002.
- Chun, K.S., Keum, Y.S., Han, S.S., Song, Y.S., Kim, S.H., Surh, Y.J. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*, 24: 1515-1524, 2003.
- Crummey, A., Harper, G.P., Boyle, E.A., Mangan, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. *Agents Actions*, 20: 69-76, 1987.
- Cunningham, F. Lipid mediators in inflammatory skin disorders. *J. Lipid. Mediat.*, 2: 61-74, 1990.
- Darshan, S., Doreswamy, R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytother. Res.*, 18: 343-357, 2004.
- Dattner, A.M. Herbal and complementary medicine in dermatology. *Dermatol. Clin.*, 22: 325-332, 2004.
- De Miranda, A.L., Silva, J.R., Rezende, C.M., Neves, J.S., Parrini, S.C., Pinheiro, M.L., Cordeiro, M.C., Tamborini, E., Pinto, A.C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sukuuba*. *Planta Med.*, 66: 284-286, 2000.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, 26: 335-341, 1989.

- Debenedictis, C., Joubeh, S., Zhang, G., Barria, M., Ghohestani, R.F. Immune functions of the skin. *Clin. Dermatol.*, 19: 573-585, 2001.
- Della Loggia, R., Tubazo, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S., Isaac, O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.*, 60: 516-520, 1994.
- Dhouailly, D., Olivera-Martinez, I., Fliniaux, I., Missier, S., Viallet, J.P., Thelu, J. Skin field formation: morphogenetic events. *Int. J. Dev. Biol.*, 48: 85-91, 2004.
- DiSepio, D., Chandraratna, R.A., Nagpal, S. Novel approaches for the treatment of psoriasis. *Drug Discov. Today*, 4: 222-231, 1999.
- Eckes, B., Krieg, T. Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 22: S73-6, 2004.
- Eisenberg, S.P., Evans, R.J., Arend, W.P., Verderber, E., Brewer, M.T., Hannum, C.H., Thompson, R.C. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, 343: 341-346, 1990.
- Erdo, F., Torok, K., Aranyi, P., Szekely, J.I. A new assay for antiphlogistic activity: zymosan-induced mouse ear inflammation. *Agents Actions*, 39: 137-142, 1993.
- Ernst, E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. *Br. J. Dermatol.*, 143: 923-929, 2000.
- Faergemann, J. Atopic dermatitis and fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 545-563, 2002.
- Fernandez, M.A., de las Heras, B., Garcia, M.D., Saenz, M.T., Villar, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J. Pharm. Pharmacol.*, 53:1533-1539, 2001.
- Fogh, K., Kragballe, K. Eicosanoids in inflammatory skin diseases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 45: 6343-6354, 2000.
- Freinkel, R.K., Woodley, D.T. *Skin Biology*. Taylor & Francis Group, New York, 2001.
- Fujii, Y., Takeuchi, H., Tanaka, K., Sakuma, S., Ohkubo, Y., Mutoh, S. Effects of FK506 (tacrolimus hydrate) on chronic oxazolone-induced dermatitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 456: 115-121, 2002.

- Gabor, M., Razga, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. *Agents Actions*, 36: 83-86, 1992.
- Garle, M.J., Fry, J.R. Sensory nerves, neurogenic inflammation and pain: missing components of alternative irritation strategies? A review and a potential strategy. *Altern. Lab. Anim.*, 31: 295-316, 2003.
- Gilroy, D.W., Lawrence, T., Perretti, M., Rossi, A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3: 401-416, 2004.
- Giner-Larza, E.M., Manez, S., Recio, M.C., Giner, R.M., Prieto, J.M., Cerda-Nicolas, M., Rios, J.L. Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *Eur. J. Pharmacol.*, 428:137-143, 2001.
- Goodwin, A.W., Wheat, H.E. Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27: 53-77, 2004.
- Gottlieb, O.R., Borin, M.R., de Brito, N.R. Integration of ethnobotany and phytochemistry dream or reality? *Phytochemistry*, 60:145-152, 2002.
- Goulet, J.L., Byrum, R.S., Key, M.L., Nguyen, M., Wagoner, V.A., Koller, B.H. Genetic factors determine the contribution of leukotrienes to acute inflammatory responses. *J. Immunol.*, 164:4899-4907, 2004.
- Grassegger, A., Hopfl, R. Significance of the cytokine interferon gamma in clinical dermatology. *Clin. Exp. Dermatol.*, 29: 584-588, 2004.
- Graham-Brown, R. Atopic dermatitis: unapproved treatments or indications. *Clin. Dermatol.*, 18: 153-158, 2000.
- Grone, A. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 88: 1-12. 2002.
- Gupta, A.K., Skinner, A.R. A review of the use of infliximab to manage cutaneous dermatoses. *J. Cutan. Med. Surg.*, 8: 77-89, 2004.
- Hasmeda, M., Kweifio-Okai, G., Macrides, T., Polya, G.M. Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Med.*, 65:14-18, 1999.
- Huguet, A., del Carmen, Recio, M., Manez, S., Giner, R., Rios, J. Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *Eur. J. Pharmacol.*, 410: 69-81, 2000.

- Ialenti, A., Ianaro, A., Maffia, P., Carnuccio, R., D'Acquisto, F., Maiello, F.M., Di Rosa, M. Role of nuclear factor-kappaB in a rat model of vascular injury. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 364: 343-350, 2001.
- Inoue, H., Mori, T., Shibata, S., Koshihara, Y. Inhibitory effect of glycyrrhetic acid derivatives on arachidonic acid-induced mouse ear oedema. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40:272-277, 1988.
- Inoue, H., Mori, T., Shibata, S., Koshihara, Y. Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. *Br. J. Pharmacol.*, 96: 204-210, 1989.
- Inoue, H., Nagata, N., Shibata, S., Koshihara, Y. Inhibitory effect of glycyrrhetic acid derivatives on capsaicin-induced ear edema in mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 71:281-289, 1996.
- Inoue, H., Nagata, N., Koshihara, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 1614-1620, 1993.
- Kalimi, M., Hubbard, J.R. Development of an exchange assay for cytosolic glucocorticoid receptors using the synergistic effect of molybdate plus dithiothreitol. *Endocrinology*, 113: 1161-1163, 1983.
- Kamonska, B., Pyrzynska, B., Ciechomska, I., Wisniewska, M. Modulation of the AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*, 60: 395-402, 2000.
- Kanitakis, J., Butnaru, A.C., Claudy, A. Novel biological immunotherapies for psoriasis. *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, 12: 1111-1121, 2003.
- Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 270: 16483-16486, 1995.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.*, 18: 621-663, 2000.
- Katz, S.I., Strober, W. The pathogenesis of dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol.*, 70: 63-75, 1978.
- Khalid, S.A. Chemistry of the Burseraceae. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F. (Eds). *Chemistry and Chemical taxonomy of the Rutales*. Academic Press, New York, 1983.
- Kim, D.K, Baek, J.H, Kang, C.M, Yoo, M.A., Sung, J.W., Chung, H.Y., Kim, N.D., Choi, Y.H., Lee, S.H., Kim, K.W. Apoptotic activity of ursolic acid may

- correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *Int. J. Cancer.*, 87: 629-636, 2000.
- Kim, S.H., Kang, I.C., Yoon, T.J., Park, Y.M., Kang, K.S., Song, G.Y., Ahn, B.Z. Antitumor activities of a newly synthesized shikonin derivative, 2-hyime-DMNQ-S-33. *Cancer Lett.*, 172:171-175, 2001.
- Kingston, D.G. Taxol: the chemistry and structure-activity relationships of a novel anticancer agent. *Trends Biotechnol.*, 12: 222-227, 1994.
- Koster, M.I., Roop, D.R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. *Eur. J. Cell Biol.*, 83: 625-629, 2004.
- Kushner, I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 9:191-196, 1998.
- Kupper, T.S., Fuhlbrigge, R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 211-222, 2004.
- Krueger, J.G., Bowcock, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann. Rheum. Dis.*, 64: 30-36, 2005.
- Kwak, W.J., Han, C.K., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Park, B.K., Kim, H.P. Effects of Ginkgetin from *Ginkgo biloba* Leaves on cyclooxygenases and in vivo skin inflammation. *Planta Med.*, 68: 316-321, 2002.
- Kweifio-Okai, G., De Munk, F., Rumble, B.A., Macrides, T.A., Cropley, M. Antiarthritic mechanisms of amyrin triterpenes. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 85: 45-55, 1994.
- Lee, K.H. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *J. Nat. Prod.*, 67:273-283, 2004.
- Leonardi, C.L. Efalizumab: an overview. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 49: 98-104, 2003.
- Leung, D.Y.M., Boguniewicz, M., Howel, M.D., Nomura, I., Hamid, Q.A. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.*, 113: 651-657, 2004
- Lim, H., Park, H., Kim, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. *Arch. Pharm. Res.*, 27: 442-448, 2004.
- Lima, F.V., Malheiros, A., Otuki, M.F., Cechinel-Filho, V., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Three New Triterpenes from Resinous Bark of

- Protium kleinii and ou Their Antinociceptive Activity. J. Brazilian Chem. Soc., 2005, no prelo.
- Lloret, S., Moreno, J.J. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. Biochem. Pharmacol., 50: 347-353, 1995.
- McCaskill, D., Croteau, R. Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 55: 107-146, 1997.
- Mantle, D., Gok, M.A., Lennard, T.W. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. Adverse Drug React. Toxicol. Rev., 20: 89-103, 2001.
- Martin, R. Interleukin 4 treatment of psoriasis: are pleiotropic cytokines suitable therapies for autoimmune diseases? Trends Pharmacol. Sci., 24: 613-616, 2003.
- Mendonça, C.O, Burden, A.D. Current concepts in psoriasis and its treatment. Pharmacol. Ther., 99: 133-147, 2003.
- Millikan, L.E., Shrum, J.P. An update on common skin diseases. Acne, psoriasis, contact dermatitis, and warts. Postgrad. Med., 91: 101-104, 1992.
- Muller-Decker, K., Neufang, G., Berger, I., Neumann, M., Marks, F., Furstenberger, G. Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99: 12483-12488, 2002.
- Murphy, J.E., Robert, C., Kupper, T.S. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. J. Invest. Dermatol., 114: 602-608, 2000.
- Nestle, F.O., Nickoloff, B.J. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. J. Clin. Invest., 13: 1664-1675, 2004.
- Nisbet, L.J., Moore, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? Curr. Opin. Biotechnol., 8(6): 708-712, 1997.
- Oliveira, F.A., Vieira-Junior, G.M., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Florencio, M.G., Lima, R.C., Jr, Silva, R.M., Santos, F.A, Rao, V.S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from Protium heptaphyllum in mice and rats. Pharmacol. Res., 49: 105-111, 2004a.

- Oliveira, F.A., Lima-Junior, R.C., Cordeiro, W.M., Vieira-Junior, G.M., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Silva, R.M., Santos, F.A., Rao, V.S. Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 78:719-725, 2004b.
- Oliveira, F.A., Vieira-Junior, G.M., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Florêncio, M.G., Lima, R.C. Jr., Silva, R.M., Santos, F.A., Rao, V.S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacol. Res.*, 49: 105-111, 2004c.
- Opas, E.E., Bonney, R.J, Humes, J.L. Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.*, 84: 253-256, 1985.
- Otuki, M.F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. *Eur. J. Pharmacol.*, 507:253-259, 2005.
- Otuki, M.F., Ferreira, J., Vieira-Lima, F., Meyre-Silva, C., Malheiros, A., Muller, L.A., Cani, G.S., Santos, A.R., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Antinociceptive properties of mixture of {alpha}- amyirin and {beta}- amyirin triterpenes: evidence for participation of PKC and PKA pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, no prelo.
- Phillipson, J.D. New drugs from nature-it could be yew. *Phytother. Res.*, 13: 2-8, 1999.
- Pickart, C.M. Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 116: 181-190, 2004.
- Pinheiro, R.M., Calixto, J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflamm. Res.*, 51: 603-610, 2002.
- Pignat, W., Kienzle, R., Bottcher, I. How specific is the arachidonic acid-induced mouse ear oedema for lipoxygenase (LO)- and cyclooxygenase (CO)-inhibitors? *Agents Actions*, 19:368-370, 1986.
- Poyner, T.S. *Common Skin Diseases*. Blackwell Publishes, London, 2000.
- Puignero, V., Queralt, J. Effect of topically applied cyclosporin A on arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation in mouse ear. *Inflammation*, 21: 357-369, 1997.
- Rates, S.M. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613, 2001.

- Raz A, Wyche A, Siegel N, Needleman P. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J. Biol. Chem.*, 263:3022-3028, 1988.
- Recio, M.C., Giner, R.M., Manez, S., Rios, J.L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.*, 61: 182-185, 1995.
- Recio, M.C., Giner, R.M., Uriburu, L., Máñez, S., Cerdá, M., De la Fuente, J.R., Ríos, J.L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci.*, 66: 2509-2518, 2000.
- Reiz, R. *Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí-SC, parte I*, 1986.
- Roberge, C.J., Grassi, J., De Medicis, R., Frobert, Y., Lussier, A., Naccache, P.H., Poubelle, P.E. Crystal-neutrophil interactions lead to interleukin-1 synthesis. *Agents Actions*, 34:38-41, 1991.
- Robert, C., Kupper, T.S. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N. Engl. J. Med.*, 341: 1817-1828, 1999.
- Ross, E.L., D'Cruz, D., Morrow, W.J. Localized monocyte chemotactic protein-1 production correlates with T cell infiltration of synovium in patients with psoriatic arthritis. *J. Rheumatol.*, 27: 2432-2443, 2000.
- Rothwarf, D.M., Karin, M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE.*, 5: RE1, 1999.
- Rowse, D.H., Emmett, E.A. Solvents and the skin. *Clin. Occup. Environ. Med.* 4: 657-730, 2004.
- Ryan, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. *Micron.*, 35: 161-171, 2004.
- Sabourin, T., Morissette, G., Bouthillier, J., Levesque, L., Marceau, F. Expression of kinin B(1) receptor in fresh or cultured rabbit aortic smooth muscle: role of NF-kappa B. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283: H227-237, 2002.
- Safayhi, H., Sailer, E.R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med.*, 63: 487-493, 1997.
- Saleem, M., Afaq, F., Adhami, V.M., Mukhtar, H. Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*, 23:5203-5214, 2004.

- Sanchez, T., Moreno, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochem. Pharmacol.*, 58: 877-879, 1999.
- Schaerli, P., Britschgi, M., Keller, M., Steiner, U.C., Steinmann, L.S., Moser, B., Pichler, W.J. Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. *J. Immunol.*, 173: 2151-2158, 2004.
- Scholzen, T.E., Stander, S., Riemann, H., Brzoska, T., Luger, T.A. Modulation of cutaneous inflammation by angiotensin-converting enzyme. *J. Immunol.*, 170: 3866-3873, 2003.
- Schon, M.P., Zollner, T.M., Boehncke, W.H. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J. Invest. Dermatol.*, 121: 951-962, 2003.
- Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S., Aggarwal, B.B. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I κ B kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res.*, 63: 4375-4383, 2003.
- Siani, A.C., Zoghbi, M.G., Wolter, E.L. Vencato, I. 5-methoxyjusticidin A, a new aryl naphthalene lignan from *Protium unifoliolatum*. *J. Nat. Prod.*, 61: 796-797, 1998.
- Siani, A.C., Ramos, M.F., Menezes-de-Lima, O., Jr, Ribeiro-dos-Santos, R., Fernandez-Ferreira, E., Soares, R.O., Rosas, E.C., Susunaga, G.S., Guimarães, A.C., Zoghbi, M.G., Henriques, M.G. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol.*, 66: 57-69, 1999.
- Singer, A.J., Clark, R.A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 341:738-746, 1999.
- Siqueira, J.B.G., Zoghbi, G.B., Cabral, J.A., Wilson, W.F. Lignans from *Protium tenuifolium*. *J. Nat. Prod.*, 58: 730-732, 1995.
- Soter, N.A. Physical urticaria/angioedema as an experimental model of acute and chronic inflammation in human skin. *Springer Semin. Immunopathol.*, 4:73-81, 1981.
- Southwell, D., Barry, B.W. Penetration enhancers for human skin: mode of action of 2-pyrrolidone and dimethylformamide on partition and diffusion of model compounds water, n-alcohols, and caffeine. *J. Invest. Dermatol.*, 80: 507-514, 1983.

- Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., Tobin, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am. J. Surg.*, 176: 26S-38S, 1998.
- Stanley, P.L., Steiner, S., Havens, M., Tramposch, K.M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacol.*, 4: 262-271, 1991.
- Strohl, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discov. Today*, 5: 39-41, 2000.
- Szallasi, A., Biro, T., Modarres, S., Garlaschelli, L., Petersen, M., Klusch, A., Vidari, G., Jonassohn, M., De Rosa, S., Sterner, O., Blumberg, P.M., Krause, J.E., Dialdehyde sesquiterpenes and other terpenoids as vanilloids. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998 356: 81-89, 1998.
- Tapondjou, L.A., Lontsi, D., Sondengam, B.L, Choi, J., Lee, K.T., Jung, H.J., Park, H.J. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. *Arch. Pharm. Res.*, 26: 143-146, 2003.
- Thepen, T., Van-Vuuren, A.J, Kiekens, R.C., Damen, C.A, Vooijs, W.C, Van De Winkel, J.G. Resolution of cutaneous inflammation after local elimination of macrophages. *Nat. Biotechnol.*, 18: 48-51, 2000.
- Thorburn, J., Carlson, M., Mansour, S.J., Chien, K.R., Ahn, N.G., Thorburn, A. Inhibition of a signaling pathway in cardiac muscle cells by active mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol. Biol. Cell.*, 6: 1479-1490, 1995.
- Towbin, H., Pignat, W., Wiesenberg, I. Time-dependent cytokine production in the croton oil-induced mouse ear oedema and inhibition by prednisolone. *Inflamm. Res.*, 44: S160-161, 1995.
- Tripp, C.S., Blomme, E.A., Chinn, K.S., Hardy, M.M., LaCelle, P., Pentland, A.P. Epidermal COX-2 induction following ultraviolet irradiation: suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. *J. Invest. Dermatol.*, 121: 853-861, 2003.
- Tilley, S.L., Coffman, T.M., Koller, B.H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Invest.*, 108: 15-23, 2001.
- Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F., Gallarate, M. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.*, 241: 319-327, 2002.

- Valledor, A.F., Ricote, M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol.*, 67: 201-212, 2004.
- Vane, J. In: Gábor M (Ed). Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Akadémiai Kiadó, Budapest, 11, 2000.
- Verpoorte, R., Memelink, J. Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 181-187, 2002.
- Verpoorte, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52: 253-262, 2000.
- Williams, I.R., Kupper, T.S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci.*, 58: 1485-1507, 1996.
- Wells, T., Basketter, D.A., Schroder, K.R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In Vitro*, 18: 231-243, 2004.
- Woolf, A. Essential oil poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 37: 721-727, 1999.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kasahara, Y., Kimura, Y., Yamanouchi, S., Kumaki, K., Tamura, T., Takido, M. Inhibitory effect of Di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 19: 1329-1331, 1996.
- Young, J.M., Spires, D.A., Bedord, C.J., Wagner, B., Ballaron, S.J., De Young, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.*, 82: 367- 371, 1984.
- Young, J.M., Wagner, B.M., Spires D.A. Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *J. Invest. Dermatol.*, 80: 48-52, 1983.
- Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16: 109-110, 1983.
- Zoghbi, M.D., Roque, N.F., Gottlieb, O.R. Propacin, a Coumarinolignoid from *Protium opacum*. *Phytochemistry*, 20: 180-182, 1981.

7. ANEXOS

- Otuki MF, Vieira-Lima F, Malheiros A, Yunes RA, Calixto JB. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, 507: 253-259, 2005.

-- Calixto JB, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Medica**, 69: 973-983, 2003.

- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, 70:93-103, 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DE
EXTRATOS E TRITERPENOS ISOLADOS
DA *PROTIUM KLEINII*.**

MICHEL FLEITH OTUKI

Tese apresentada ao Curso
de Pós-graduação em
Farmacologia como requisito para
obtenção do título de Doutor em
Farmacologia.

**Orientador: Prof. João Batista
Calixto**

Florianópolis-SC
Fevereiro / 2004

ORIENTADOR

Prof. Dr. João Batista Calixto

Os experimentos foram realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina durante o curso de Pós-graduação em Farmacologia, nível Doutorado, com auxílio financeiro do Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq). Alguns experimentos foram realizados nos laboratórios da Prof. Dra. Maria Christina W. de Avellar (Departamento de Farmacologia), da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM) e também no laboratório do Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. João Batista Calixto**, pela orientação, apoio e liberdade de trabalho concedida durante todo período de iniciação científica e doutorado. Proporcionando todas as condições para meu crescimento profissional.

À **Prof. Dr. Ana Maria Viana** pela ajuda e estímulo nos primeiros passos da minha carreira científica.

Aos meus pais **Ivone Maria Fleith** e **João Kiyoshi Otuki** pela educação, apoio e incentivo durante toda minha vida.

Aos professores **Valdir Cechinel Filho**, **Rosendo Yunes**, **Ângela Malheiros** e **Fabiana Vieira Lima** pelo isolamento e fornecimento dos extratos e compostos utilizados nesse estudo.

A **Rodrigo Medeiros** pela significativa colaboração nos experimentos de Biologia Molecular.

Ao amigo **Juliano Ferreira** pelo convívio e orientação durante o período de iniciação científica e doutorado.

À **Daniela de Almeida Cabrini** pela atenção, apoio e carinho durante este período.

A todos os **professores, funcionários e colegas** do Departamento de Farmacologia.

A **CAPES** e ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

Há um dom acima de todos os outros que torna o homem único entre os animais [...] o imenso prazer de exercer e aprimorar sua habilidade [...] A descoberta é uma dupla relação de análise e síntese. Como análise, ela sonda à procura do que existe [...] Como síntese, une as partes de maneira que a mente criativa transcenda o esqueleto simples fornecido pela Natureza.

Jacob Bronowski

"A gente sempre deve sair à rua como quem foge de casa. Como se estivessem abertos diante de nós todos os caminhos do mundo. Não importa que os compromissos, as obrigações, estejam ali... Chegamos de muito longe, de alma aberta e o coração cantando!"

Mário Quintana

IL	Interleucina
LOX	Lipoxigenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NAG	<i>N</i> -acetil- β - <i>D</i> -glucosaminidase
NF-κB	Fator nuclear- κ B
PG	Prostaglandina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
TPA	12-O-tetradecanoilforbol acetato
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado de uma secção transversal de pele.....	02
Figura 2 – Esquema simplificado de uma secção transversal da epiderme.....	03
Figura 3 – Núcleo comum dos triterpenos pentacíclicos.....	16
Figura 4 – Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos isolados da <i>P. kleinii</i>	17
Figura 5 – Foto da planta <i>Protium kleinii</i>	18
Figura 6 – Efeito do extrato éter, extrato hexano, extrato clorofórmio obtidos da <i>P. kleinii</i> e da dexametasona administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo TPA.....	40
Figura 7 – Efeito do extrato éter da <i>P. kleinii</i> ou da dexametasona administrados topicamente sobre o edema de orelha e na atividade da enzima mieloperoxidase de orelhas tratadas com TPA.....	41
Figura 8 – Efeito da breina, AF-29, CB-25, α -amirina e dexametasona administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo TPA.....	43
Figura 9 – Efeito da α -amirina e da dexametasona administradas topicamente sobre o edema de orelha e a atividade da enzima mieloperoxidase de orelhas tratadas com TPA.....	44
Figura 10 – Cortes verticais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (40 x) 24 h após a aplicação de TPA.....	46
Figura 11 – Efeito do extrato éter de <i>P. kleinii</i> e da α -amirina administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pela capsaicina.....	47
Figura 12 - Efeito da α -amirina e da capsaicina sobre a união específica da [³ H]-resiniferatoxina na medula espinhal de ratos.....	48
Figura 13 - Efeito do extrato éter da <i>P. kleinii</i> , da α -amirina e da fenidona administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico	49
Figura 14 – Efeito do extrato éter de <i>P. kleinii</i> , α -amirina ou dexametasona administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo fenol.....	50
Figura 15 - Efeito do extrato éter de <i>P. kleinii</i> , α -amirina ou dexametasona administrados topicamente sobre o edema de orelha induzido pelo zimosan.....	51

Figura 16 – Efeito do extrato éter da <i>P. kleinii</i> , da α -amirina e dexametasona (dexa) administradas topicamente sobre o edema e a atividade da enzima mieloperoxidase de orelhas tratadas com oxazolona	53
Figura 17 – Efeito da α -amirina e da dexametasona administrados topicamente nos níveis de IL-1 β após a aplicação do TPA	54
Figura 18 – Efeito da α -amirina e da dexametasona administrados topicamente nos níveis de PGE ₂ após a aplicação do TPA.....	55
Figura 19 – Efeito da α -amirina, SC560 e rofecoxib na atividade das enzimas COX-1 e COX-2 em ensaio <i>in vitro</i>	56
Figura 20- Efeito da α -amirina e da dexametasona (mg/orelha) sobre os níveis da enzima COX-2 em orelhas de camundongos tratados com TPA.....	58
Figura 21 – Efeito da α -amirina e dexametasona (mg/orelha) na formação do complexo NF- κ B/DNA nuclear pelo ensaio de EMSA em orelhas de camundongos tratados com TPA.....	60
Figura 22 – Efeito da α -amirina e da dexametasona (mg/orelha) sobre os níveis da enzima JNK em orelhas de camundongos tratados com TPA.....	62
Figura 23 – Efeito da α -amirina e da dexametasona (mg/orelha) sobre os níveis da enzima p38 em orelhas de camundongos tratados com TPA.....	63
Figura 24 – Efeito da α -amirina e da dexametasona (mg/orelha) sobre os níveis da enzima ERK em orelhas de camundongos tratados com TPA.....	64
Figura 25 – Efeito da α -amirina e dexametasona (dexa) administrados topicamente no edema de orelha induzido pelo TPA e na atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glucosaminidase de homogenatos de orelhas tratadas com TPA.....	66
Figura 26 – Cortes verticais de orelhas de camundongos coradas com PAS coletadas após aplicação repetida de TPA.....	67
Figura 27 – Cortes verticais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina coletadas após aplicação repetida de TPA.....	69
Figura 28 – Espessura da epiderme (μ m) após aplicação repetida de TPA.....	70
Figura 29 – Efeito da α -amirina e dexametasona no ensaio de união específica da [³ H]-dexametasona em pulmão de ratos.....	71
Figura 30 – Esquema proposto para o efeito antiinflamatório da α -amirina.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de patologias cutâneas com envolvimento de inflamação.....	08
Tabela 2 – Plantas medicinais utilizadas na prática terapêutica dermatológica.	15
Tabela 3 – Avaliação do potencial irritante da α -amirina.....	72
Tabela 4 – Avaliação do potencial fotossensibilizante da α -amirina.....	73

RESUMO

Protium kleinii é uma espécie vegetal exclusiva da costa atlântica do sul do Brasil, encontrada somente nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Na medicina popular a *P. kleinii* é usada no tratamento de inflamações cutâneas, gangrenas e úlceras. A aplicação tópica do extrato éter da *P. kleinii* (EE) assim como dos compostos triterpenos isolados da mesma, a α -amirina, breína, 3-ceto-11-hidroxi-ursa-12-eno, 3-oxo-11-hidroxi-olea-12-eno e 3-oxo-11-16-di-hidroxi-ursa-12-eno, reduziram significativamente o edema de orelha induzido pelo TPA. A avaliação da atividade antiinflamatória do triterpeno α -amirina e do EE demonstrou que estes são capazes de reduzir, de forma dependente da dose, o edema e a migração de polimorfonucleares causada pela aplicação tópica de TPA. Além disso, a α -amirina e o EE foram eficazes também em inibir o edema de orelha induzido pelo fenol (solvente irritante), zimosan (polissacarídeos de parede celular de fungos) e a oxazolona (agente sensibilizador cutâneo). O estudo do mecanismo de ação antiinflamatório da α -amirina demonstrou que este composto é capaz de reduzir os níveis da citocina IL-1 β e da prostaglandina E₂ (PGE₂) no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA. A diminuição dos níveis de PGE₂ causada pela α -amirina parece estar relacionado com a inibição da expressão da enzima COX-2. Porém, a α -amirina não interferiu na fosforilação das MAPKs p38, JNK e ERK sugerindo que este composto inibe o processo inflamatório em pontos mais inferiores das vias de sinalização celular como o NF- κ B. De fato a α -amirina foi capaz em inibir a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B causada pela aplicação tópica de

TPA em orelhas de camundongos. Frente a um modelo de inflamação cutânea crônica causada pela aplicação repetida de TPA, a α -amirina reduziu eventos como o edema, a proliferação celular na epiderme e a migração de células polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos gerados por este agente flogístico. Testes preliminares de irritação e fotossensibilização demonstram que o uso tópico da α -amirina parece ser seguro. Concluindo, os resultados do presente estudo demonstram que o triterpeno pentacíclico α -amirina pode interferir com diversas vias envolvidas no processo inflamatório e dessa forma poderia constituir em mais um candidato promissor para o desenvolvimento de um medicamento para patologias relacionadas com a inflamação cutânea.

ABSTRACT

Protium kleinii (Burseraceae) is a native Brazilian plant, exclusive in the south states of Brazil (Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul). In folk medicine *P. kleinii* is claimed to be useful to treat some inflammatory skin diseases, gangrene and ulcers. Topical application of the ether extract or some active isolated compounds, such as pentacyclic triterpene α -amyrin, breína, 3-ceto-11-hidroxi-ursa-12-ene, 3-oxo-11-hidroxi-olea-12-ene e 3-oxo-11-16-dihidroxi-ursa-12-ene all caused a dose-related inhibition of ear oedema caused by topical application of 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate (TPA). The evaluation of anti-inflammatory activity of triterpene α -amyrin and the EE has demonstrated that both are capable of reducing the ear oedema and polymorphonuclear cells migration induced by TPA topical application. Besides, α -amirin and EE were able to also inhibit the ear oedema induced by other irritants, such as the phenol (irritant solvent), zimosan (fungus from cell wall polissacaride) and oxazolone (sensitizer cutaneous agent). The analysis of α -amyrin anti-inflammatory mechanism of action has demonstrated that it is able to reduce the IL-1 β and prostaglandin E₂ (PGE₂) levels in the TPA-induced ear edema model. The reduction in PGE₂ levels caused by α -amyrin seems to be related to the inhibition of COX-2 enzyme expression. However, α -amyrin did not interfered to MAPKs p38, JNK e ERK phosphorylation, suggesting that this compound appear to act in a deeper steps of cell signalling pathways in the inflammatory process like the NF- κ B. In fact, α -amyrin was capable of inhibit the activation of NF- κ B transcription factor following the ear topical application of TPA. Confrontation with

a chronic cutaneous inflammation model caused by repetitive application of TPA, α -amyrin reduced the oedema, cell proliferation to epidermis and the migration of polymorphonuclear cells, macrophages and lymphocytes, generated by the flogistic agent. Irritation and photosensitization preliminary tests demonstrated that the topical usage of α -amyrin is safe. In conclusion, the results of the present study demonstrate that the pentacyclic triterpene α -amyrin can interfere with several steps involved in the inflammatory process and, in this manner could be one more promising candidate to the development of a new medicine for the treatment of pathologies related to cutaneous inflammation.

Os resultados do presente trabalho estão parcialmente publicados ou estão

submetidos a publicação em:

- **Otuki MF**, Vieira-Lima F, Malheiros A, Yunes RA, Calixto JB. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology*, 507: 253-259, 2005.
- **Otuki MF**, Medeiros R, Avelar MCW, Calixto JB. Involved mechanisms in the antiinflammatory effect of the α -amyrin pentacyclic triterpene. *British Journal of Pharmacology*

Outros trabalhos publicados durante o período de doutorado:

- **Otuki MF**, Ferreira J, Vieira-Lima F, Meyre-Silva C, Malheiros A, Muller LA, Cani GS, Santos AR, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive properties of mixture of α - amyrin and β - amyrin triterpenes: evidence for participation of PKC and PKA pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005, *no prelo*.
- Lima FV, Malheiros A, **Otuki MF**, Cechinel-Filho V, Delle Monache F, Yunes RA, Calixto JB. Three New Triterpenes from Resinous Bark of *Protium kleinii* and ou Their Antinociceptive Activity". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005, *no prelo*.
- Calixto JB, **Otuki MF**, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta Medica*, 69: 973-983, 2003.
- Calixto JB, Campos MM, **Otuki MF**, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*, 70:93-103, 2004.
- **Otuki MF**, Lima FV, Malheiros A, Cechinel-Filho V, Delle Monache F, Yunes RA, Calixto JB. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. *Life Science*, 69: 2225-2236, 2001.
- Calixto JB, Scheidt C, **Otuki MF**, Santos, ARS. Biological Activity of plants extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opinion in Emerging Drugs*, 6: 261-279, 2001.