

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO**

MARCELO SOUZA DE ARAUJO

Avaliação farmacológica do extrato bruto hidroalcólico da *Gomphrena globosa* em dois diferentes modelos experimentais – edema de pata e inflamação pulmonar aguda

**São José dos Campos, SP
2009**

MARCELO SOUZA DE ARAUJO

Avaliação farmacológica do extrato bruto hidroalcólico da *Gomphrena globosa* em dois diferentes modelos experimentais – edema de pata e inflamação pulmonar aguda

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Wellington Ribeiro

**São José dos Campos, SP
2009**

A69a

Araujo, Marcelo Souza de

Avaliação farmacológica do extrato bruto hidroalcoólico da *Gomphrena globosa* em dois diferentes modelos experimentais: edema de pata e inflamação pulmonar aguda / Marcelo Souza de Araujo Orientadores: Prof. Dr. Wellington Ribeiro. São José dos Campos, 2009.

1 Disco laser: color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

1. Edema de Pata - Inflamação 2. Carragenina 3. *Gomphrena globosa* 4. LPS
I. Ribeiro, Wellington, Orient. II. Título

616.24

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada à fonte.



Assinatura do aluno

Data: 07/07/2009

MARCELO SOUZA DE ARAUJO

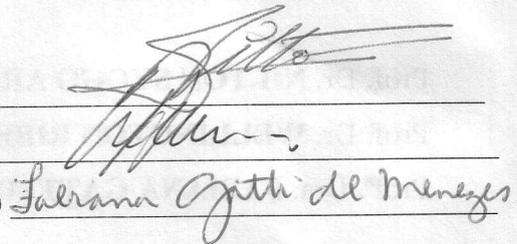
**“AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCÓOLICO DA
GOMPHRENA GLOBOSA EM DOIS DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS – EDEMA
DE PATA E INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **NILTON SYOGO ARAKAWA** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **WELLINGTON RIBEIRO** (UNIVAP) _____

Profª. Dra. **FABIANA GATTI DE MENEZES** (USP) _____



Profª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 07 de julho de 2009.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha mãe pelo seu imenso esforço

...durante a caminhada de meus estudos, e por sempre acreditar em mim.

...ao meu padrasto por me amar incondicionalmente, como um verdadeiro pai.

...A minha irmã pelo incentivo e apoio.

...A minha esposa, pela sua tolerância e paciência durante a realização deste trabalho.

...E aos meus amigos que de uma forma ou outra me ajudaram nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e perseverança para nunca desistir de meus objetivos.

Em especial ao Professor Dr. Wellington Ribeiro pelo ensinamento, sugestões e por sua receptividade em todos os momentos deste trabalho.

Ao Professor Dr. Marcos José Salvador (UNICAMP) pelas sugestões, ensinamentos e por disponibilizar o extrato da *Gomphrena globosa*.

Aos Professores Drs. José Carlos Cogo e Stella Regina Zamuner (UNICAMP) pelas sugestões, e as colaborações a esta pesquisa permitindo o acesso a seus laboratórios.

A mestranda Erika F. Ferrari e a graduada Fabiana V. Requena, pelas suas preciosas ajudas durante a realização deste trabalho.

As secretárias: Sra. Ivone V. Monteiro, Sra. Neuza de Moraes Macias Delgado, Valéria Maeda, por estarem sempre disponíveis nas horas que precisei.

As Bibliotecárias: Rosangela Regis Cavalcanti e Rubia Gravito C. Gomes, pelo grande apoio e receptividade durante a realização deste trabalho.

Ao amigo Professor Dr. Raduan Haggi pelo apoio durante esta pesquisa.

Ao amigo Professor Mestre Fabio Jardini (UNIP) pela sua generosa contribuição durante a realização desta pesquisa.

E a todos aqueles que por diversas formas puderam contribuir para a realização deste trabalho.

Avaliação farmacológica do extrato bruto hidroalcoólico da *Gomphrena globosa* em dois diferentes modelos experimentais – edema de pata e inflamação pulmonar aguda

RESUMO

A planta *Gomphrena globosa* (*Amaranthaceae*) conhecida popularmente como perpétua, amaranto-globoso, gonfrena, perpétua-roxa. Utilizada na medicina popular no combate à febre, asma e bronquite. Avaliou-se aqui o efeito farmacológico do extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas da planta *Gomphrena globosa*, através de dois modelos experimentais *in vivo*. Em um deles foi realizado o teste de edema de pata induzida por carragenina, administrado nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg pela via oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.). O diclofenaco sódico (10 mg/kg, i.p.) foi usado como controle positivo do teste. As doses e vias testadas reduziram significativamente o edema de pata. A partir desses resultados, é provável que um dos mecanismos de ação dos constituintes do extrato bruto no modelo de edema de pata é devida à inibição da ciclooxigenase. Entretanto as diferenças obtidas em relação às vias de administração do extrato devem-se possivelmente devido à absorção e biodisponibilidade do extrato. Já no modelo de inflamação pulmonar aguda induzido por lipopolissacarídeos (LPS), nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg do extrato pela via i.p. , tendo a dexametasona (5 mg/kg i.p.) como controle positivo, demonstrou que o grupo extrato 500 mg/kg i.p. teve os melhores resultados em relação as outras doses, mas não comparável a ação da dexametasona, sugerindo uma ação imunomodulatória do extrato. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram para o emprego de plantas do gênero *Gomphrena* na medicina popular visto que o extrato bruto hidroalcoólico de *Gomphrena globosa* possui efeito antiinflamatório, sugerindo suas potencialidades para fins terapêuticos. Entretanto, novos estudos necessitam ser realizado para garantir seu uso seguro.

Palavras-chave: *Gomphrena globosa*, Carragenina, LPS, Inflamação.

**Evaluation pharmacological of *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae)
hydroalcoholic crude extract for two different experiments – paw edema and
acute lung inflammation**

ABSTRACT: The *Gomphrena globosa* plant (Amaranthaceae) popularly known as perpétua, amaranto-globoso, gonfrena, perpétua-roxa. Used in popular medicine against fever, asthma and bronchitis. It was evaluated here the pharmacological effect of the hydroalcoholic crude extract of aerial parts of the plant *Gomphrena globosa*, using two experimental *in vivo* models. In one of them was the test of paw edema induced by carrageenan, using the crude extract, administered in doses of 100, 250 and 500 mg / kg via oral (v.o.) and intraperitoneal (i.p.). The diclofenac sodium (10 mg / kg, ip) was used as positive control for the test. The doses and pathways tested reduced significantly the paw edema. From these results, it is supposed that one of the mechanisms of action of the constituents of the crude extract is due to COX inhibition. However the differences results obtained for pathways of administration of the extract should be possibly due to absorption and bioavailability of the extract. Already in the model of acute lung inflammation induced by lipopolysaccharides (LPS) at doses of 100, 250 and 500 mg / kg of the extract (i.p.) has the dexamethasone (5 mg / kg ip) as positive control, showed that the group extract 500 mg / kg i.p. had the best results when compared to other doses, but not comparable the action of dexamethasone, suggesting an immunomodulatory activity of the extract. The results of this study support the use of plants of the genus *Gomphrena* in popular medicine since the crude extract of *Gomphrena globosa* hidroalcolico has anti-inflammatory effect, suggesting its potential for therapeutic purposes. However, new studies need to be done to ensure its safe use.

KEYWORD: *Gomphrena globosa*, Carrageenan, LPS, Inflammation.

Lista de figuras

Figura 1	<i>Gomphrena globosa</i> : a) escanerata do ramo com flores; b) escanerata com detalhe da flor (Banco de imagens – Lafit Botu)	20
Figura 2	Curva dose efeito antiedematogêncio do extrato v.o	34
Figura 3	Curva dose efeito antiedematogêncio do extrato i.p.	35
Figura 4	Análise do efeito antiedematogênico do extrato administrado v.o. e i.p. versus diclofenaco sódico	36
Figura 5	Efeito do extrato sobre o número de células totais no LBA.	38
Figura 6	Efeito do extrato sobre o número de neutrófilos no LBA.	38
Figura 7	Efeito do extrato sobre os níveis de IL-12 no LBA.	39

Lista de abreviaturas

- COX Ciclooxygenase
- AINES Antiinflamatórios não esteroidais
- FiO₂ Fração inspirada de oxigênio
- IL Interleucina (PaO₂/
- i.n. via Intranasal
- i.p. via Intraperitoneal
- LBA Lavado Broncoalveolar
- LPA Lesão pulmonar aguda
- LPS Lipopolissacarídeo
- LT Leucotrieno
- PAF Fator ativador de plaquetas
- PaO₂ Pressão parcial de oxigênio arterial
- PEEP Pressão positiva expiratória final
- PG_s Prostaglandinas
- SARA Síndrome da angústia respiratória aguda
- TNF- α Fator de necrose tumoral- α
- v.o. Via oral

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 INFLAMAÇÃO	14
1.1.1 Medicamentos Antiinflamatórios	15
1.2 DOENÇAS PULMONARES: SÍNDROME DE ANGÚSTIA RESPIRATÓRIA AGUDA (SARA) E LESÃO AGUDA PULMONAR (LPA)	16
1.2.1 Definição de SARA/LPA	16
1.2.2 O processo inflamatório na SARA/LPA	17
1.3 FAMÍLIA AMARANTHACEAE	18
1.3.1 Gênero <i>Gomphrena</i>	18
1.3.2 <i>Gomphrena globosa</i>	19
1.4 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 PROCESSO DE EXTRAÇÃO	26
3.1.1 Material Botânico	26
3.1.2 Obtenção do Extrato	26
3.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA	26
3.2.1 Animais	26
3.2.2 Avaliação do edema de pata	27
3.2.3 Efeito antiinflamatório do extrato em modelo de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS	29
3.2.3.1 Indução da inflamação pulmonar aguda induzido por LPS e avaliação farmacológica do extrato	29
3.3 PROTOCOLO DE ANESTESIA E EUTANÁSIA	31
3.4 COLETA DO LBA	31
3.5 DETERMINAÇÃO DE IL-12	32
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS	34
4.1 ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA	34

4.1.1 Edema de pata induzido pela carragenina	34
4.2 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	37
4.2.1 Inflamação pulmonar aguda por LPS.....	37
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO

Os estágios iniciais do processo inflamatório envolvem mudanças locais no fluxo sanguíneo (vasodilatação com aumento da permeabilidade das vênulas, extravasamento de fluídos e formação do edema) combinado a migração de várias células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos) no foco da inflamação. As alterações no fluxo sanguíneo são desencadeadas por diferentes mediadores que se originam do plasma ou de células locais, e que podem ser ampliados ou modificados por produtos liberados das células inflamatórias que migraram para o local da inflamação (RYAN; MAJNO, 1977; HENSON, 2005; POBER; SESSA, 2007). Os principais mediadores envolvidos nas alterações vasculares são histamina, fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas (PG_s), prostaciclina (PG_1), o sistema das cininas (ex. bradicinina), fatores do complemento (C3a, C4a e C5a), fatores do sistema de coagulação e sistema fibrinolítico e tromboxano (SPRINGER, 1995; HENSON, 2005).

O recrutamento de leucócitos no foco inflamatório é um fenômeno complexo que depende da natureza do estímulo, dos mediadores quimiotáticos liberados e da expressão de moléculas de adesão (SCHIFFMANN, 1982; TEGUI; MALLAT, 2006; SERHAN; SAVILL, 2005). Dentre os fatores quimiotáticos podemos citar os quimioatraentes para neutrófilos e eosinófilos que podem ser derivados de fosfolípídeos de membrana como o leucotrieno B₄ (LTB₄) e o PAF (SANTANGELO et al., 2007). Os fatores quimioatraentes também podem ser protéicos como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8), fragmento C5a do complemento, as quimiocinas como CCL5 (RANTES), CCL-7 (MCP-3), CCL-13 (MCP-4) e CCL11 (eotaxina-1) que são importantes quimioatraentes para eosinófilos, sendo importantes alvos terapêuticos na asma e em doenças alérgicas (BAGGIOLINI et al., 1997; OLIVEIRA; LUKACS, 2003).

As PG_s consistem em um dos principais mediadores da inflamação, edema, dor e febre (VANE; BOTTING, 2003) e são originadas pela oxidação do ácido

araquidônico, com ação das enzimas ciclooxigenases COX-1 (constitutiva) e/ou COX-2 (induzida) (VANE; BOTTING, 2003; ROWLEY et al., 2005; BOTTING, 2006).

1.1.1 Medicamentos Antiinflamatórios

Os medicamentos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos são usados para o alívio do edema, da dor e da febre nas desordens teciduais, em doenças alérgicas e nas doenças inflamatórias crônicas (CELOTTI; LAUFER, 2001; FLOWER, 2003; KILPIO; HANNUKSELA, 2003). Os antiinflamatórios não esteróides (AINES) formam um grupo heterogêneo com compostos quimicamente não relacionados, mas com efeitos terapêuticos similares: antiinflamatório, analgésico e antipirético. Os efeitos terapêuticos e colaterais dos AINES resultam da inibição da enzima ciclooxigenase por estes compostos. Assim, tais agentes reduzem a síntese de prostaglandinas, diminuindo a intensidade do processo inflamatório. Dependendo da seletividade dos AINES, eles podem inibir as enzimas COX-1 e 2 ou somente a COX-2 (VANE; BOTTING, 2003). A COX-1 como fisiologicamente constitutiva, agindo como citoprotetora gástrica e mantenedora da homeostase renal e plaquetária e a COX-2 ou indutiva, presente em situação de trauma tissular e inflamação, observa-se que inibidores específicos da COX-2 impedem o processo inflamatório sem os efeitos colaterais indesejáveis, principalmente distúrbios gastrintestinais, advindos do bloqueio inespecífico da COX. (KUMMER; COELHO, 2002). Foi descrita uma terceira isoenzima, COX-3, que ocorre no córtex cerebral e no tecido cardíaco humano, tida como uma variação da COX-1. Esta isoenzima foi inibida por analgésicos e antipiréticos como acetaminofeno, dipirona e alguns outros AINES (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

Os glicocorticóides e os AINES são os principais medicamentos antiinflamatórios conhecidos. Os glicocorticóides são amplamente usados na supressão da inflamação nas doenças crônicas. A ação antiinflamatória deve-se à ligação do glicocorticóide a receptores protéicos específicos no citoplasma, que então é translocado para o núcleo, ligando-se ao gene alvo inibindo a transcrição de vários genes para citocinas, enzimas, receptores e moléculas de adesão.

Conseqüentemente inibem fatores de transcrição como fator nuclear- κ B e a proteína ativadora-1. Aumentam ainda a transcrição de proteínas antiinflamatórias como lipocortina-1, IL-10 e antagonista do receptor de IL-1 (PEREIRA et al., 2007). Inibem também a fosfolipase A2 e conseqüentemente a formação de PG_s e LT_s , reduzindo assim o recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o foco inflamatório (VANE; BOTTING, 1987; FLOWER, 2003; CAMPOS, 2007).

1.2 DOENÇAS PULMONARES: SÍNDROME DE ANGÚSTIA RESPIRATÓRIA AGUDA (SARA) E LESÃO AGUDA PULMONAR (LPA)

1.2.1 Definição de SARA/LPA

A Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) é uma síndrome clínica comum, grave, caracterizada por lesão pulmonar aguda (LPA), que afeta tanto pacientes clínicos quanto cirúrgicos, adultos ou crianças (WARE; MATTHAY, 2000). Sua definição e descrição foram redefinidas desde então para melhor incorporação do espectro clínico da doença, bem como para melhor correlação da definição com a fisiopatologia da síndrome (ASHBAUGH et al., 1967).

Em 1994, uma nova definição foi estabelecida pelo “American-European Consensus Conference Committees,” e essa foi amplamente adotada por clínicos e pesquisadores da área na identificação da LPA. Segundo o consenso, a LPA foi conceituada como uma síndrome caracterizada por inflamação pulmonar aguda e persistente, com edema pulmonar devido ao aumento da permeabilidade vascular, associada a três aspectos clínicos (BERNARD et al., 1994; ARTIGAS et al., 1998):

- a) Infiltrado radiológico alveolar bilateral;
- b) Relação entre a pressão parcial de oxigênio arterial e a fração inspirada de oxigênio (PaO_2/FiO_2) entre 201 e 300 mmHg, independente do valor da pressão positiva expiratória final (PEEP);
- c) Ausência de evidência clínica de elevação da pressão atrial esquerda.

A SARA, por sua vez, apresenta definição semelhante à LPA, exceto pela presença de hipoxemia grave, identificando-se uma relação entre PaO_2/FiO_2 igual ou menor a 200 mmHg, independente do valor PEEP (GALHARDO; MARTINEZ, 2003; BURLESON; MAKI, 2005). Portanto, considera-se que a SARA representa o estágio mais grave do espectro da LPA.

1.2.2 O processo inflamatório na SARA/LPA

A barreira alvéolo-capilar é formada pelo endotélio vascular e o epitélio alveolar. A fase aguda da SARA/LPA é caracterizada pela presença de um exsudato protéico no espaço alveolar, como consequência do aumento na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar (GEISER, 2003; PIANTADOSI; SCHWARTZ, 2004).

Admite-se que na SARA/LPA ocorre uma lesão do epitélio alveolar e do endotélio capilar por diferentes mediadores pró-inflamatórios, particularmente pelas citocinas, tais como o TNF- α , IL-1 e IL-8, liberadas em resposta a uma grande variedade de lesões (lesão pulmonar direta ou indireta). Como consequência, os neutrófilos são atraídos e tornam-se ativados, liberando mediadores inflamatórios, como oxidantes e proteases, que lesam diretamente o epitélio alveolar e o endotélio vascular, propagando o processo inflamatório. Além disso, pesquisas recentes demonstram que não apenas a produção de citocinas pró-inflamatórias é importante, mas também o balanço entre mediadores pró e antiinflamatórios (MEDURI et al., 1995; SOUZA et al., 2003; MATTHAY; ZIMMERMAN, 2005).

As lesões pulmonares que ocorrem na SARA/LPA provavelmente se originam da ativação sistêmica dos neutrófilos circulantes, que se aderem ao endotélio vascular dos capilares pulmonares. Os neutrófilos liberam enzimas proteolíticas e espécies reativas do oxigênio, causando dano ao endotélio e rupturas nos capilares com exsudação para dentro do parênquima pulmonar, que então preenche os espaços alveolares (MATUTE-BELLO et al., 1997; ATABAI ; MATTHAY, 2002).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado a ocorrência de dano mediado por neutrófilos na SARA/LPA. Avaliações histológicas obtidas em estágios iniciais da SARA/LPA mostram um grande acúmulo de neutrófilos. Também é possível encontrar um grande número de neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA)

obtidos de pacientes com SARA/LPA (MATUTE-BELLO et al., 1997; ATABAI; MATTHAY, 2002).

Em resumo a resposta inflamatória pulmonar é caracterizada por modificações na reatividade das vias aéreas e ativação de células residentes, como mastócitos, macrófagos e células epiteliais, que secretam mediadores químicos, responsáveis, entre outras ações, pela constrição das vias aéreas e pelo influxo acentuado de leucócitos para o foco de lesão. Para tanto, os leucócitos circulantes interagem com o endotélio da parede de vênulas pós-capilares próximas à área inflamada e migram, por entre as junções interendoteliais, em direção ao sítio de lesão. Neste local, os leucócitos liberam substâncias armazenadas em grânulos intracelulares e secretam mediadores recém-sintetizados que, em conjunto, facilitarão a destruição do agente lesivo e a subsequente resolução do processo inflamatório. No entanto, modificações nestas atividades celulares acarretam prejuízos ao tecido inflamado, quer seja pela ineficácia da resposta e manutenção da lesão, ou por exacerbação do processo, com conseqüente prejuízo aos mecanismos de reparo e regeneração tecidual (REYNOLDS, 1987; WARD; HUNNINGHAKE, 1998; TRACEY, 2002).

1.3 FAMÍLIA *AMARANTHACEAE*

1.3.1 Gênero *Gomphrena*

Historicamente, as plantas, seus produtos de extração e seus metabólitos secundários vêm sendo utilizados pela humanidade como terapêutico desde o início de nossa civilização (MCCURDY; SCULLY, 2005). Mesmo com o grande desenvolvimento de fármacos obtidos a partir de síntese orgânica, eles continuam desempenhando um papel de destaque na saúde pública. Mais de 25% dos medicamentos em uso são derivados naturais ou produtos semi-sintéticos de origem natural. O uso popular de plantas na medicina tradicional é uma grande fonte para descoberta de novos agentes terapêuticos. Mas o conhecimento popular deve estar

associado à bioensaios para comprovar a eficácia e a toxicidade destas plantas para o uso terapêutico (YUNES et al., 2001; CLARDY; WALSH, 2004; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Desse modo, o mercado mundial envolvendo plantas medicinais e substâncias extraídas dos mesmos (que são utilizadas diretamente como fármacos ou que servem de base para o desenvolvimento de novos medicamentos) movimentam vários bilhões de dólares, sendo uma atividade muito lucrativa para as indústrias, principalmente as farmacêuticas (BRISKIN, 2000; CALIXTO, 2000; VAN WIJK, 2000).

A família *Amaranthaceae* compreende aproximadamente 65 gêneros e 1000 espécies, dentre as quais se destacam os gêneros *Pfaffia* com aproximadamente 100 espécies e *Gomphrena* com aproximadamente 120 espécies tropicais e subtropicais, especialmente nativas da América e da Austrália (SALVADOR et al., 2004). Em relação ao gênero *Gomphrena* são conhecidas espécies que possuem propriedades medicinais, ornamentais e invasoras. No Brasil ocorrem 46 espécies do gênero *Gomphrena* e 19 delas ocorrem no Cerrado. Desde 1982, já se citava a utilização das raízes de *Gomphrena arborescens*, no Distrito Federal, no combate à febre, asma e bronquite. Seis espécies de *Gomphrena* são usadas na medicina popular - *Gomphrena arborescens*, *Gomphrena globosa*, *Gomphrena leucocephala*, *Gomphrena pohlii*, *Gomphrena vaga* e *Gomphrena mollis* - a maioria contra infecções nas vias respiratórias e como febrífugas ou tônicas, com utilização, principalmente das raízes (GAVILANES, 1999; FANK DE CARVALHO; GRACIANO-RIBEIRO, 2005; FERREIRA et al., 2004; MUSSURY et al., 2006; MUSSURY et al., 2008).

1.3.2 *Gomphrena globosa*

A *Gomphrena globosa* é uma planta herbácea ornamental e medicinal com até 1 m de altura; possui um talo ereto e pubescente, com ramos abundantes e curtos, opostos; as folhas são simples, opostas, elíptico-lanceoladas e pilosas; as flores se apresentam reunidas em inflorescências capitulares nas cores roxa, rosada

ou amarelo e branco, sendo a roxa a cor mais encontrada. Provavelmente originária da América tropical, também é encontrada no sul da Ásia e tem ampla distribuição na América do Sul. Possui um ciclo de vida anual com fácil crescimento em clima quente e apresenta resistência ao calor e a estiagem. É conhecida popularmente como perpétua, amaranto-globoso, gonfrena e perpétua-roxa (EDWARD et al, 1999; DI STASI; LIMA, 2002).

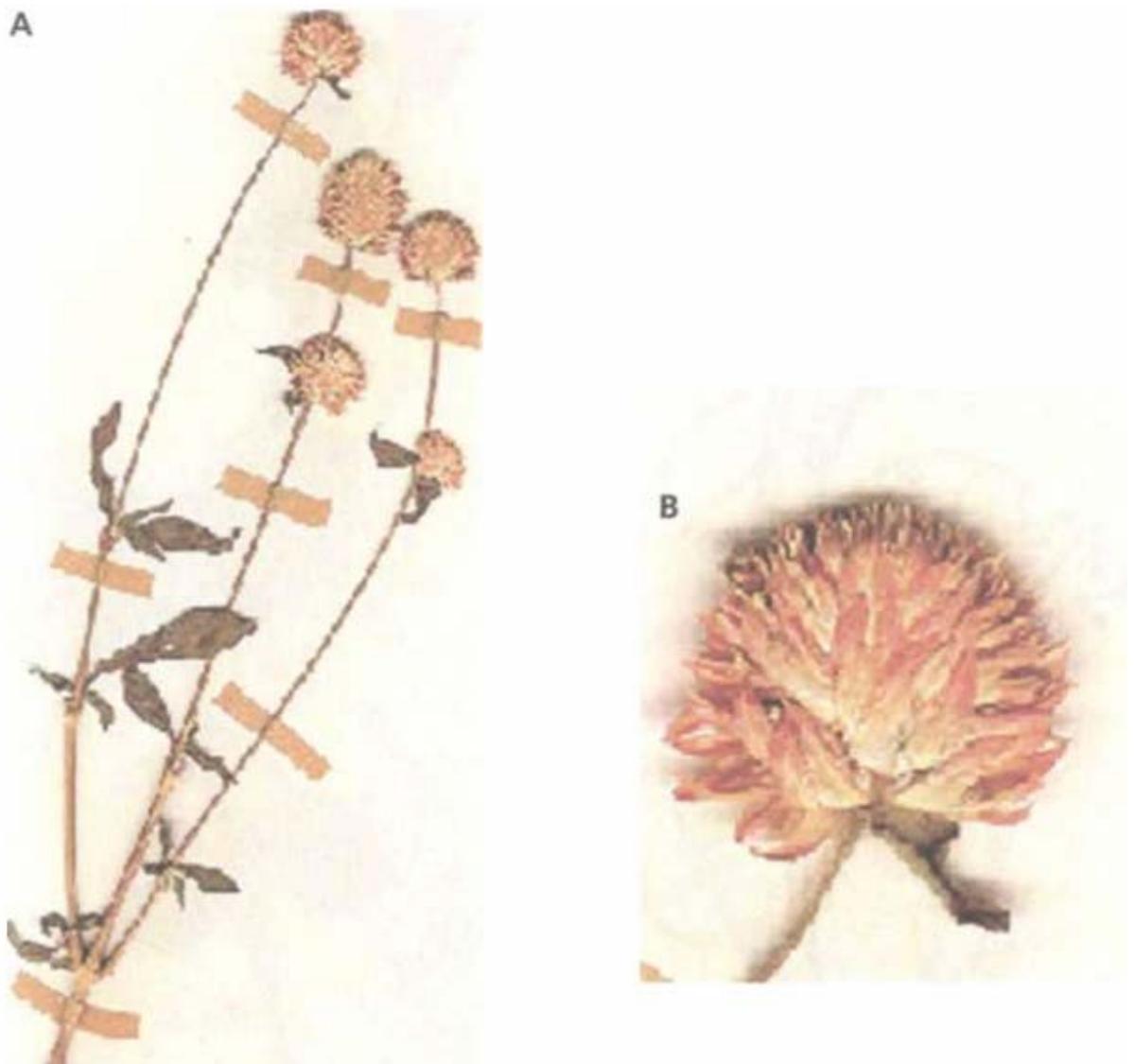


Figura 1 - *Gomphrena globosa*: a) escanerata do ramo com flores; b) escanerata com detalhe da flor (Banco de imagens – Lafit Botu)

Estudos fitoquímicos de várias espécies de *Gomphrena* demonstraram que o gênero abriga um vasto perfil de metabólitos secundários conhecidos. Em um

trabalho, foi identificado um triterpeno no extrato bruto hexânico de *Gomphrena agrestis*. Do extrato bruto etanólico desta planta foram isoladas e identificadas os compostos: ecdisteróide, flavonóide glicosilado, E-aurona glicosilada (E-3-O-d-glucopyranosyl-4,5,6,4-tetrahydroxy-7,2-dimethoxyaurone) e derivados do ácido cinâmico (FERREIRA et al., 2004). Num outro estudo com o extrato bruto hexânico de *Gomphrena claussenii* foram isolados e identificados: triterpenos (olean-12-en-3,11-dione e 3-oxo-11a,12a-epoxy-d-friedoolean-14-ene) e substâncias aromáticas nitrogenadas (aurantiamide e aurantiamide acetate). Do seu extrato bruto etanólico, foram identificados os compostos: irisone B e kaempferol-3-O-b-d-glucopyranoside (FERREIRA; DIAS, 2004).

O estudo histoquímico das folhas de *Gomphrena arborescens* demonstrou que elas são ricas em celulose, oxalato de cálcio, proteínas, lignina e compostos fenólicos, entre eles os flavonóides (CARVALHO; RIBEIRO, 2005)

Em outro trabalho foi realizado um estudo fitoquímico de três variedades de *Gomphrena globosa*, com extratos da planta *in natura* utilizando diversas técnicas cromatográficas que permitiram o isolamento de diferentes classes de substâncias. As substâncias identificadas foram: esteróides (estigmasterol, campesterol e β -sitosterol), triterpenóides (lupeol, β -amirina, amirina, taraxerona, taraxerol e epitaraxerol), saponinas (estigmasta-5-en-3 β -O-D-glucopiranosídeo, estigmasta-7-en-3 β -O-D-glucopiranosídeo), ácido 3,4-dimetoxibenzóico, ácido 4-metoxi-3-hidroxibenzóico ácido palmítico, alantoína, adenosina, 4',5-diidroxi-6,7-metilenodioxiflavonol-3-O- β -D-Glicose, 4',5-diidroxi-6,7 metilenodioxiflavonol, 2-hidroximetil-uridina (ANDRÉ, 2004).

1.4 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

O Lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina bacteriana, sendo um potente indutor de ativação celular e capaz de induzir a secreção de grande número de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, no qual tem funções chaves na migração leucocitária (KARIMA et al., 1999).

No tecido, ou na cavidade abdominal no caso das administrações intraperitoniais (i.p.), o LPS induz à exposição de selectinas (P e E) de células

endoteliais dos vasos. Essas selectinas se ligam à glicoproteínas de neutrófilos e monócitos que, favorecidos pela inflamação local (principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular), migram para o tecido. Em geral, nas primeiras 6 h ocorre a migração maciça de neutrófilos (que representam a primeira linha de defesa da imunidade inata), e posteriormente de monócitos. Dessa forma o LPS também pode ser utilizado como um modelo de inflamação, com recrutamento de neutrófilos, monócitos e indução de produção de citocinas (MARTIN, 1999; TASAKA et al., 2003; BASIT et al., 2006)

Resumindo, a administração de LPS em um tecido ou cavidade é responsável pelo recrutamento de neutrófilos por selectina, ativação de macrófagos residentes e produção de citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-1 e IL6 (YEH et al., 2007; REN et al., 2008).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar a atividade antiinflamatória do extrato bruto hidroalcolico das partes aéreas da planta *Ghomphrena globosa* em dois modelos de inflamação aguda em camundongos:

- Edema de pata induzido por carragenina.
- Inflamação pulmonar aguda induzida por LPS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar através do modelo de edema de pata, a ação do extrato bruto hidroalcolico das partes aéreas da *Ghomphrena globosa* frente à carragenina administrado por duas diferentes vias:

- Via oral
- Via intraperitoneal

b) Avaliar através do modelo de inflamação pulmonar por LPS, a resposta do extrato bruto hidroalcolico das partes aéreas da *Ghomphrena globosa*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

3.1.1 Material Botânico

O material vegetal (partes aéreas) de *Gomphrena globosa* (*Amaranthaceae*) foi coletado em Ribeirão Preto-SP (Campus da UNAERP) e a identificação botânica foi efetuada pelo Prof. Dr. Josafá Carlos de Siqueira (PUC-RJ), sendo uma exsicata depositada no Herbário Friburguense (Nova Friburgo-RJ), sob o número de registro SCAB 4050.

3.1.2 Obtenção do Extrato

Para o preparo do extrato bruto hidroalcolico do material vegetal (partes aéreas) foi seco em estufa com ar circulante (temperatura inferior a 50°C) e pulverizado em moinho de faca. O pó foi então submetido à extração exaustiva (maceração) utilizando a mistura etanol/água (7:3, v/v) como solvente extrator, na proporção material vegetal/solvente extrator de 1:20 p/v. Após remoção do solvente por rotaevaporação e liofilização obteve-se o extrato bruto hidroalcolico.

3.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c, adultos jovens, com 06 semanas de idade, pesando $18,30 \text{ g} \pm 1,25$ provenientes do biotério da Fazenda Bem-te-vi, Campinas, São Paulo. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-25°C), luminosidade (ciclo claro e escuro de 12 horas), e umidade relativa (70%). A alimentação constou de água “*ad libitum*” e ração em quantidades diárias de 4 a 5 g/camundongo (Purina Labina[®], São Paulo, Brasil).

Todos os procedimentos seguiram as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA/91) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVAP, protocolo nº A035/2006/CEP.

3.2.2 Avaliação do edema de pata

Para o ensaio da atividade antiedematogênica, foram utilizados 60 camundongos (n=5). A carragenina na dose de 500 µg/pata foi diluída em salina estéril (0,9%), em um volume final de 50 µl, e injetado por via subcutânea (s.c.), no coxim plantar da pata direita posterior dos camundongos, enquanto a pata esquerda recebeu apenas salina estéril (50 µl, s.c.) como controle. Os grupos tratados receberam:

- Extrato bruto hidroalcolólico de *Ghomphrena globosa*, em três diferentes doses (100 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg), pela via oral (v.o.) com o uso de cânula (gavagem) ou pela via intraperitoneal (i.p.) conforme a etapa, diluídas em volume constante de 100µl de salina estéril, administrado 30 minutos antes da aplicação intraplantar da carragenina

- Diclofenaco sódico na dose de 10 mg/Kg por i.p., diluído em volume constante de 100 µl de salina estéril, administrado 30 minutos antes da aplicação intraplantar da carragenina.

O grupo controle carragenina recebeu igual volume de salina estéril (0,9%) por v.o. ou i.p. conforme a etapa administrada 30 minutos antes da aplicação intraplantar da carragenina.

O edema de pata foi quantificado por pletismógrafo (modelo 7150, Ugo Basile Co. Varese, Italy), de acordo com o método descrito por VAN ARMAN et al. em 1965, através da medida do volume da pata até a articulação tíbio-társica, sendo a primeira medida realizada imediatamente antes da injeção do agente irritante e as demais determinadas nos seguintes tempos: 30 min, 1, 2 e 3 horas após a injeção da carragenina. O edema foi expresso em porcentagem de acordo com o aumento do volume da pata injetada com relação ao volume inicial. O volume final foi determinado através da razão entre os volumes da pata experimental (injetada com carragenina) e da pata controle (injetada com salina).

A ação antiedematogênica do extrato bruto e do diclofenaco sódico foi expressa em porcentagem de inibição do edema, de acordo com a fórmula:

$\% \text{ de Inibição} = (1 - Et/Ec) \times 100$, em que Et e Ec representam a porcentagem do edema das patas nos grupos tratados e controle, respectivamente.

Para a realização do modelo experimental de edema de pata foram utilizadas três etapas:

a) Curva dose efeito antiedematogêncio do extrato v.o.:

•**Grupo controle:** Carragenina (salina estéril 0,9%, v.o.) após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

•**Grupo extrato 100:** Extrato (100 mg/kg, v.o.), após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

•**Grupo extrato 250:** Extrato (250 mg/kg, v.o.), após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

•**Grupo extrato 500:** Extrato (500 mg/kg, v.o.), após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

b) Curva dose efeito antiedematogêncio do extrato i.p.:

•**Grupo controle:** Carragenina (salina estéril 0,9%, i.p.) após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

•**Grupo extrato 100:** Extrato (100 mg/kg, i.p.), após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

•**Grupo extrato 250:** Extrato (250 mg/kg, i.p.), após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

•**Grupo extrato 500:** Extrato (500 mg/kg, i.p.), após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

c) Análise do efeito antiedematogênico do extrato na dose mais efetiva das vias v.o. e i.p. versus o diclofenaco sódico:

•**Grupo controle:** Carragenina (salina estéril 0,9%, i.p.) após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

•**Grupo extrato v.o.:** Extrato (Dose v.o. com melhor efeito antiedematogênico), após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

•**Grupo extrato i.p.:** Extrato (Dose i.p. com melhor efeito antiedematogênico), após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

•**Grupo diclofenaco sódico:** Diclofenaco sódico (10 mg/kg, i.p.), após 30 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina.

3.2.3 Efeito antiinflamatório do extrato em modelo de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS

3.2.3.1 Indução da inflamação pulmonar aguda induzido por LPS e avaliação farmacológica do extrato

Sob anestesia inalatória (Halotano), o LPS de *Escherichia coli* sorotipo 055: B5 (Sigma) foi instilado por via intranasal (i.n.) com o auxílio de uma micropipeta automática de 100 µl, na dose de 0,5 mg/kg do peso corporal, diluído em 60 µl de salina estéril.

Os grupos tratados receberam:

- Extrato bruto hidroalcolico de *Ghomphrena globosa*, em três diferentes doses (100 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg) administradas por via i.p., diluídas em volume constante de 100 µl de salina estéril, administradas 30 minutos antes da instilação nasal do LPS.

- Dexametasona na dose de 5 mg/kg por via i.p. diluída em volume constante de 100 µl de salina estéril, administrada 30 minutos antes da instilação nasal do LPS.

Os grupos controle e LPS receberam igual volume de salina estéril (0,9%) por i.p., administrado 30 minutos antes da instilação nasal de salina estéril (0,9%) e LPS respectivamente.

A ação antiinflamatória do extrato bruto e da dexametasona foi expressa em porcentagem de redução do influxo celular ou níveis de IL-12, de acordo com a fórmula:

$\% \text{ de redução} = (1 - V_t/V_c) \times 100$, em que V_t e V_c representam a média dos valores obtidos nos grupos tratados e controle, respectivamente.

Para o ensaio, foram utilizados 42 camundongos (n=7), divididos em seis grupos:

- **Grupo controle:** Salina estéril 0,9% i.p, após 30 minutos receberam salina estéril 0,9% (60 µl, i.n.)

- **Grupo LPS:** Salina estéril 0,9% i.p, após 30 minutos receberam LPS (0,5mg/kg, i.n.).

- **Grupo dexametasona:** Dexametasona (5 mg/kg, i.p.), após 30 minutos receberam LPS (0,5 mg/kg, i.n.).

- **Grupo extrato 100:** Extrato (100 mg/kg, i.p.), após 30 minutos receberam LPS (0,5 mg/kg, i.n.).

- **Grupo extrato 250:** Extrato (250 mg/kg, i.p.), após 30 minutos receberam LPS (0,5 mg/kg, i.n.).

•**Grupo extrato 500:** Extrato (500 mg/kg, i.p.), após 30 minutos receberam LPS (0,5 mg/kg, i.n.).

3.3 PROTOCOLO DE ANESTESIA E EUTANÁSIA.

Vinte e quatro horas após a administração i.n. de LPS ou salina estéril (0,9%), os animais foram anestesiados i.p. com ketamina 150 mg/kg e xilazina 65 µg/kg. Após a coleta do LBA os animais foram sacrificados com solução de Cloreto de Potássio (10%) administrado por via intracardiaca.

3.4 COLETA DO LBA.

Os animais foram anestesiados e posteriormente traqueostomizados e canulados com um cateter de polietileno conectado a um dispositivo de três vias. Os pulmões foram lavados três vezes com 0,5 ml de PBS (1,5 ml). Do volume de 1 ml recuperado do LBA foram retirados 20 µL de cada amostra, os quais foram diluídos em 380 µL de solução de Turk (azul de metileno 0,5% em 30% de ácido acético glacial), para a contagem do número total de células presentes no LBA, sendo a contagem feita em câmara de Neubauer, utilizando-se critérios morfocitológicos. O volume restante do LBA foi centrifugado a uma temperatura de 4°C e a uma velocidade de 1000 rpm durante 10' (minutos). O sobrenadante do LBA foi coletado e armazenado a uma temperatura de - 80°C para futuras análises. O botão de células foi ressuscitado em 0,98 ml de PBS (NaCl 0,15M, 5mM de tampão fosfato de sódio pH 7,4) e deste, quatro amostras de 200 µl foram colocadas em uma citocentrífuga na qual foram processadas a uma velocidade de 500 rpm durante 10' (minutos), o material resultante foi colocado em lâminas e corado com Instant-Prov (Newprov) essas lâminas foram utilizadas para a contagem diferencial das células utilizando-se critérios morfocitológicos. Foram contadas 100 células em cada uma das lâminas.

3.5 DETERMINAÇÃO DE IL-12

A citocina IL-12 de perfil Th1 foi dosada pelo método ELISA *sandwich*. Utilizou-se um anticorpo monoclonal (ac de rato anti-citocina de camundongo) de detecção biotilado, uma enzima, a Streptavidin-HRP (“Horsedishperoxidase”) e o peróxido de hidrogênio com tetrametilbenzidina (TMB) como revelador. Foi adicionada solução de parada (HCl 1N).

O ensaio foi feito de acordo com as instruções do fabricante do método ELISA Mouse Cytoset™ (BioSource™, Belgium). As amostras foram lidas em 450 nm, no leitor de ELISA μ Quant™ (Biotek Instruments Inc., USA).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Tukey.

Foi utilizado o Software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA). Resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA

4.1.1 Edema de pata induzido pela carragenina

A administração de carragenina nas patas dos camundongos promoveu um aumento progressivo do volume das patas que foi mensurado a partir de 30 min após a aplicação do agente irritante, apresentando pico máximo na 3ª hora.

A figura 2 ilustra o efeito antiedematogênico do extrato em três diferentes doses v.o. frente ao estímulo da carragenina.

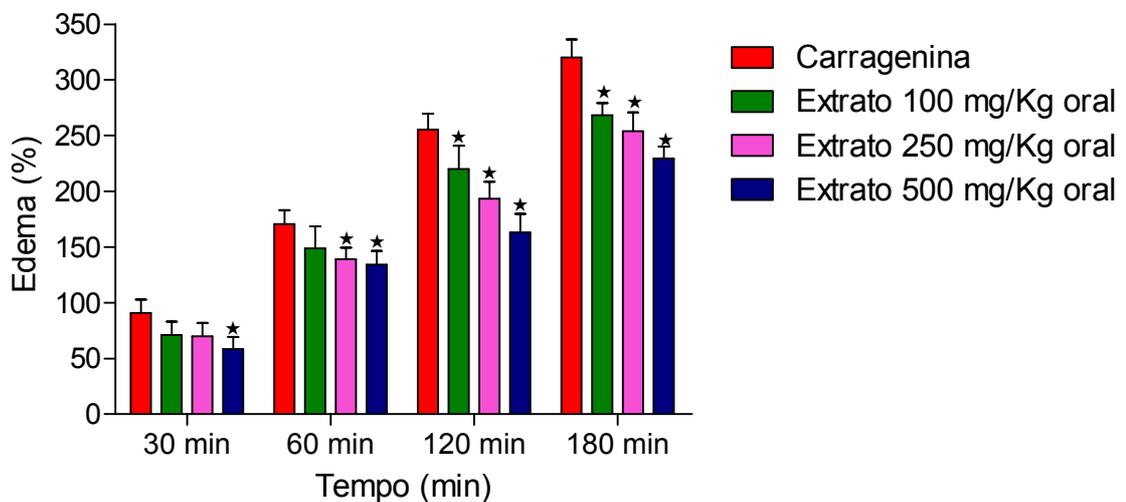


Figura 2: Avaliação da atividade antiedematogênica do extrato bruto hidroalcoólico da *Gomphrena globosa* em três diferentes doses: 100 250 e 500 mg/kg via oral, administrados meia hora antes da injeção de 0,50 µg/pata de carragenina. Os dados representam à média ± DP, n = 05, * p < 0.05 quando comparado com o grupo carragenina.

Ao compararmos as três doses do extrato v.o., realizadas 30 minutos antes da indução do edema por carragenina, observou-se que a dose de 100 mg/kg do extrato administrada por v.o. no período de 2 e 3 horas apresentou um efeito antiedematogênico estatisticamente significativo quando comparado com o grupo

controle carragenina (* $p < 0,05$) de 13,88 % e 16,10 % respectivamente. Nos períodos de 30 min e 1 hora, esta dose não apresentou um efeito antiedematogênico estatisticamente significativo em relação ao grupo controle carragenina. Enquanto a dose de 250 mg/kg v.o. nos períodos de 1, 2 e 3 horas apresentou um efeito antiedematogênico em relação ao grupo controle carragenina de 18,42%, 24,30% e 20,61% respectivamente, não sendo significativo no período de 30 minutos. Já a dose de 500 mg/kg v.o. nos períodos de 30 min, 1, 2 e 3 horas em relação ao grupo controle carragenina apresentou um efeito antiedematogênico de 35,56%, 21,04%, 36,14% e 28,28% respectivamente. De acordo com esses resultados, foi determinada a dose de 500 mg/kg de extrato v.o. como a dose que apresentou melhor efeito antiedematogênico frente ao estímulo induzido pela carragenina.

A figura 3 ilustra o efeito antiedematogênico do extrato em três diferentes doses i.p. frente ao estímulo da carragenina.

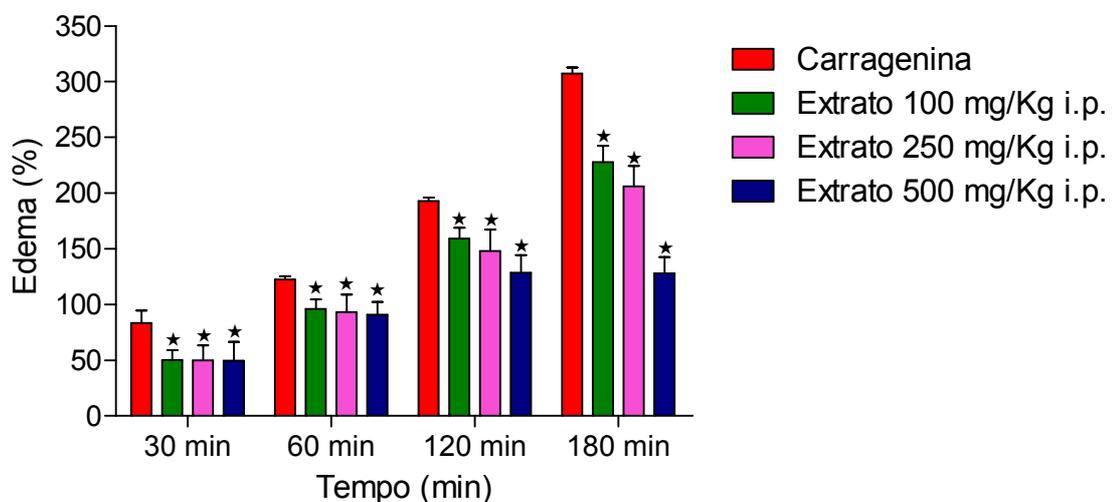


Figura 3: Avaliação da atividade antiedematogênica do extrato bruto hidroalcoólico da *Gomphrena globosa* em três diferentes doses: 100 250 e 500 mg/kg via i.p. administrados meia hora antes da injeção de 0,50 μ g/pata de carragenina. Os dados representam à média \pm DP, n = 05, * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo carragenina.

Ao compararmos as três doses do extrato i.p., realizadas 30 minutos antes da indução do edema por carragenina, observou-se que todas as doses do extrato administradas por i.p. em 30 min, 1, 2 e 3 horas apresentaram um efeito antiedematogênico estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle carragenina (* $p < 0,05$). A dose de 100 mg/kg i.p. nos períodos de 30 min, 1,

2 e 3 horas apresentou um efeito antiedematogênico em relação ao grupo controle carragenina de 39,84%, 21,78%, 17,44% e 25,87% respectivamente. Enquanto a dose de 250 mg/kg i.p. nos períodos de 30 min, 1, 2 e 3 horas apresentou um efeito antiedematogênico em relação ao grupo controle carragenina de 40,34%, 24,13%, 23,29% e 32,87% respectivamente. Já a dose de 500 mg/kg i.p. nos períodos de 30 min, 1, 2 e 3 horas em relação ao grupo controle carragenina apresentou um efeito antiedematogênico de 40,64%, 25,85%, 33,26% e 58,34% respectivamente.

De acordo com esses resultados, foi determinada a dose de 500 mg/kg de extrato i.p. como a dose que apresentou melhor efeito antiedematogênico frente ao estímulo induzido pela carragenina.

A figura 4 ilustra o efeito antiedematogênico do extrato para as duas diferentes vias, a v.o. e a i.p. *versus* o diclofenaco sódico, frente ao estímulo da carragenina na dose que apresentou melhor resultado nas etapas anteriores.

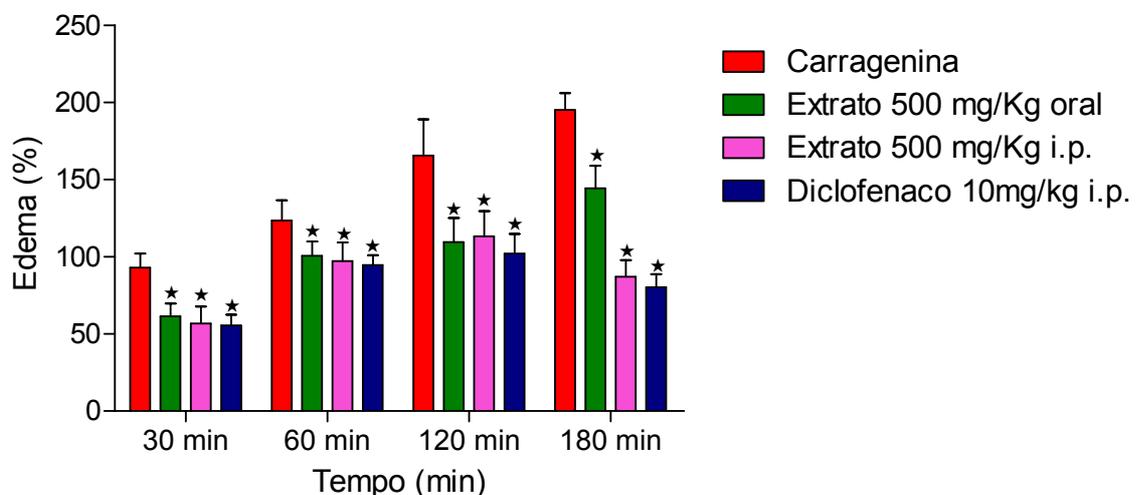


Figura 4: Avaliação da atividade antiedematogênica do extrato bruto hidroalcoólico da *Gomphrena globosa* na dose de 500 mg/kg pelas duas diferentes vias de administração, oral e i.p. *versus* o Diclofenaco sódico (10 mg/kg, via i.p.) administrados meia hora antes da injeção de 0,50 µg/pata de carragenina. Os dados representam à média ± DP, n = 05, * p < 0.05 quando comparado com o grupo carragenina.

Ao compararmos a dose de 500 mg/kg do extrato por v.o. e i.p. em relação ao diclofenaco sódico (10 mg/kg i.p.) realizada 30 minutos antes da indução do edema por carragenina, observou-se que o extrato v.o. (500 mg/kg) no período de 30 min, 1, 2 e 3 horas apresentou um efeito antiedematogênico estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle carragenina (*p<0,05) de 34,00%, 18,52%,

33,87% e 26,05% respectivamente. Enquanto o extrato i.p. (500 mg/kg) nos períodos de 30 min, 1, 2 e 3 horas apresentou um efeito antiedematogênico estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle carragenina (*p<0,05) de 39,01%, 21,27%, 31,58% e 51,24% respectivamente. Já o diclofenaco sódico (10 mg/kg, i.p.) nos períodos de 30 min, 1, 2 e 3 horas apresentou um efeito antiedematogênico estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle carragenina (*p<0,05) de 40,30%, 22,66%, 38,28% e 58,92% respectivamente.

De acordo com esses resultados, determinou-se que a via i.p. de administração do extrato, foi a que apresentou o melhor efeito antiedematogênico frente ao estímulo induzido pela carragenina, com ação semelhante ao diclofenaco sódico (10 mg/kg i.p.)

4.2 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

4.2.1 Inflamação pulmonar aguda por LPS

As figuras 5 e 6 ilustram o efeito do extrato em três diferentes doses i.p. sobre a migração celular no LBA após a indução com LPS.

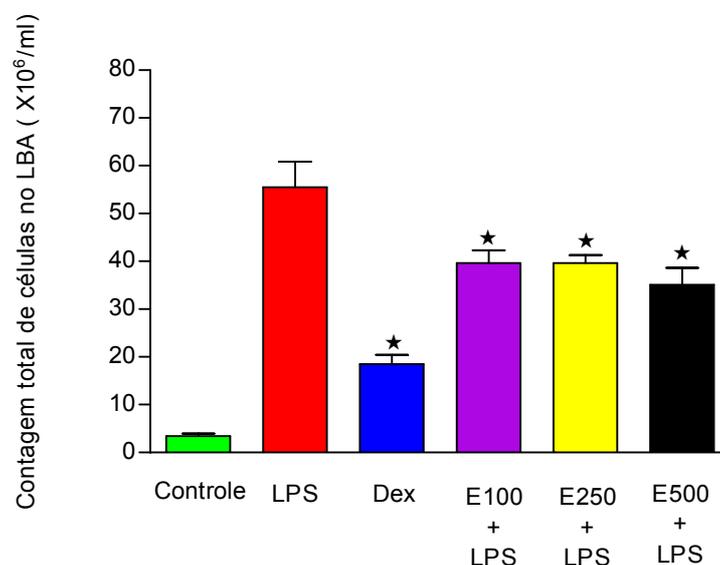


Figura 5: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico da *Gomphrena globosa* em três diferentes doses: 100 250 e 500 mg/kg via i.p., administrados meia hora antes da instilação de 0,5 mg/kg i.n. de LPS sobre o número de células totais no LBA. Os dados representam à média \pm DP, n = 05, * p < 0.05 quando comparado com o grupo LPS.

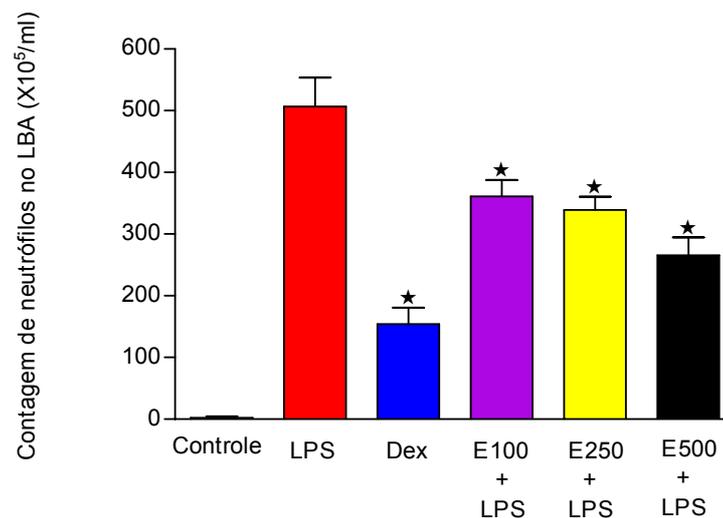


Figura 6: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico da *Gomphrena globosa* em três diferentes doses: 100 250 e 500 mg/kg via i.p., administrados meia hora antes da instilação de 0,5 mg/kg i.n. de LPS sobre o número de neutrófilos no LBA. Os dados representam à média \pm DP, n = 05, * p < 0.05 quando comparado com o grupo LPS.

Observou-se que todos os grupos desafiados pelo LPS e tratados com o extrato nas três doses (100, 250 e 500 mg/kg i.p.) ou dexametasona (5 mg/kg i.p.), tiveram redução estatisticamente significativa do número de células totais e neutrófilos no LBA em relação ao grupo LPS (*p<0,05). As doses do extrato i.p. de 100, 250 e 500 mg/kg apresentaram uma redução em relação ao grupo LPS de 28,57%, 28,57% e 36,81% respectivamente do numero de células totais no LBA e reduziram em 28,68%, 32,95% e 47,56% respectivamente o número de neutrófilos no LBA em relação ao grupo LPS. Já a dexametasona (5mg/kg i.p.) reduziu em 66,66% o número de células totais no LBA, enquanto em relação ao número de neutrófilos observou-se uma redução de 69,56% em relação ao grupo LPS.

Com os resultados podemos determinar que a dose de 500 mg/kg i.p. do extrato foi a que melhor apresentou redução no processo de migração celular no LBA. No entanto, esta dose não apresentou uma redução próxima aos níveis da dexametasona (5 mg/kg i.p.).

A figura 7 ilustra o efeito do extrato em três diferentes doses i.p. em relação aos níveis de IL-12 no LBA após a indução com LPS.

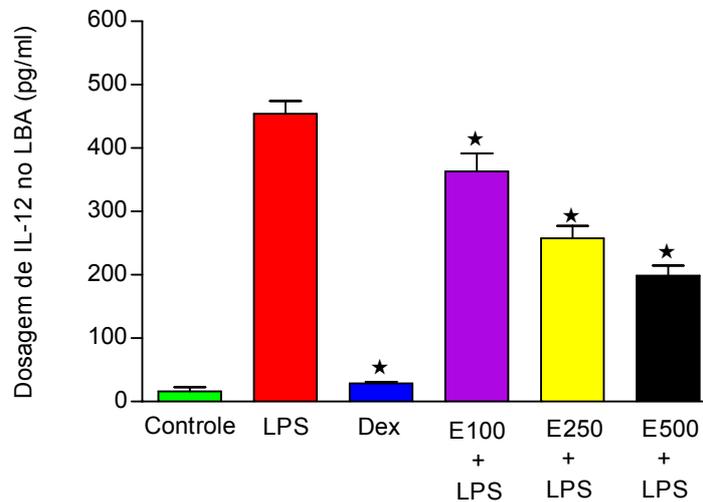


Figura 7: Efeito do extrato bruto hidroalcoólico da *Gomphrena globosa* em três diferentes doses: 100, 250 e 500 mg/kg, via i.p., administrados meia hora antes da instilação de 0,5 mg/kg i.n. de LPS em relação aos níveis de IL-2 no LBA. Os dados representam à média \pm DP, n = 05, * p < 0.05 quando comparado com o grupo LPS.

Observou-se que todos os grupos desafiados pelo LPS e tratados com o extrato nas três doses (100, 250 e 500 mg/kg i.p.) ou dexametasona (5 mg/kg i.p.) promoveram uma redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-12 no LBA quando comparadas com o grupo LPS (*p<0,05). A dose de 100, 250 e 500mg/kg do extrato i.p. reduziram os níveis de IL-12 no LBA em 26,48%, 43,42% e 48,91% respectivamente quando comparadas com o grupo LPS. Enquanto a dexametasona (5mg/kg i.p.) apresentou uma redução de 93,94% quando comparada com o grupo LPS.

Vemos pelos resultados que novamente a dose de 500 mg/kg i.p. do extrato foi a que melhor apresentou redução dos níveis de IL-12 no LBA, mas também não apresentou uma redução próxima aos níveis da dexametasona (5 mg/kg i.p.).

5 DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais, de forma de vários fitoterápicos ou isolada, como fármacos antiinflamatórios e analgésicos na medicina popular é uma prática comum, proporcionando alívio de sintomas comparável àquele obtido com medicamentos alopáticos, embora na maioria das vezes os princípios ativos das plantas sejam desconhecidos (ABAD et al., 1996; MCCURLEY; SCULLY, 2005).

Desta forma um crescente número de estudos relacionados à atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral e citotóxica de algumas espécies vegetais encontradas no Brasil tem sido realizado (HOLETZ et al., 2002)

A maioria dos fármacos clinicamente importantes para o tratamento de várias doenças inflamatórias pertence a classes químicas: não-esteroidais ou esteroidais. Embora estes fármacos tenham atividade poderosa, eles possuem vários e severos efeitos adversos.

Embora a utilização destas plantas tenha uma tradição, e seus usos medicinais e segurança sejam bem conhecidos pelos povos nativos, torna-se necessário a realização de um maior número de estudos científicos para testar sua eficácia, propriedades e limitações (ABAD et al., 1996). Assim, a avaliação dos efeitos farmacológicos de extratos brutos vegetais deve ser utilizada como uma estratégia de pesquisa lógica para a busca de novas moléculas (JAVAN et al., 1997; ORTHOLAND; GANESAN, 2004). Como exemplo podemos citar o estudo de algumas plantas, as quais possuem uma ampla variedade de constituintes ativos na sua composição, bem como diversas atividades biológicas. Tais como o isoflavonóide pterocarpano ericristagalina, isolado da espécie *Erythrina mildbraedii* (*Fabaceae*), que apresentou atividade antioxidante, atuando de forma inibitória no metabolismo do ácido araquidônico via lipoxigenase-5, promovendo a redução do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos (NJAMEN et al., 2003).

Protocolos experimentais nos quais o processo inflamatório é induzido agudamente, têm sido utilizados para estudos desta reação, abordando a participação de mediadores químicos de diferentes tipos celulares, além de possibilitar a avaliação de fármacos com suposta atividade antiinflamatória. Entre os modelos pode-se citar: indução de edema de pata, pleurisia, bolsa de ar no dorso e artrite (UETRECHT, 2006; SURALKAR et al., 2008).

O edema de pata induzido pela carragenina foi originalmente descrito em ratos por WINTER et al. (1962), no entanto, tem se observado um perfil semelhante de atividade antiinflamatória na resposta em camundongos (SUGISHITA et al., 1981). Este teste caracteriza-se pela injeção intraplantar de um polissacarídeo de origem marinha, a carragenina, que gera um quadro de inflamação aguda e é caracterizado pela liberação seqüencial de mediadores inflamatórios. Durante os 60 minutos (fase inicial) possivelmente ocorre à liberação de histamina e serotonina. A segunda fase, que se estende até aproximadamente 150 minutos caracteriza-se pela liberação de bradicinina. Na terceira fase, até os 360 minutos (fase de edema persistente), ocorre a produção local de PG_s (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971; POSADAS et al. , 2004).

O processo de inibição do edema causado por carragenina envolve mecanismo relacionado com a síntese de PG_s , sendo comparável a ação exercida pelo AINE. A via da COX é inibida por antiinflamatórios não esteróides impedindo a formação de PG_s . O fármaco padrão de referência para nosso modelo experimental foi o diclofenaco sódico, um AINE consagrado na terapêutica cuja ação antiinflamatória e efeito analgésico estão relacionados à inibição da enzima COX e redução da liberação dos derivados do ácido aracdônico com afinidade para isoformas COX-1 e COX-2 (BURITOVA et al., 1995; BOTTING, 2006).

No nosso estudo de edema de pata pela carragenina a redução do processo edematogênico nos grupos de animais que receberam o extrato foi observada em todos os tratamentos Estas reduções foram do tipo dose- dependente. Com isso, podemos pensar que seja provável que um dos mecanismos de ação dos constituintes do extrato bruto hidroalcolico das partes aéreas de *Gomphrena globosa* neste modelo, poderia estar relacionada à inibição da COX, porém mais testes são necessários para comprovar esta hipótese. NETO et al (2005) num estudo com extrato bruto da raiz da *Pfaffia glomerata* que pertence a mesma família da *Gomphrena globosa* (*Amaranthaceae*) mostrou resultado semelhante para este modelo de inflamação.

As vias administradas apresentaram uma resposta diferenciada frente ao ensaio adotado. Ao compararmos a dose que apresentou melhor efeito antiedematogênico no pico do edema (180 min.), para as duas vias de administração do extrato (500 mg/kg v.o. e i.p.) frente ao diclofenaco sódico (10 mg/kg i.p.), observou se que a via i.p. foi a que promoveu maior redução do edema, semelhante

ao fármaco. As diferenças obtidas em relação às vias de administração do extrato bruto hidroalcolóico de *Gomphrena globosa* devem-se possivelmente à metabolização dos compostos ativos que estes sofrem no organismo, envolvendo aspectos relacionados à absorção e biodisponibilidade dos mesmos.

Quando se administra um fármaco por v.o., sua absorção pelo tubo gastrointestinal e, conseqüentemente, sua concentração sanguínea, são dependentes de vários fatores, como solubilidade, pKa do fármaco, circulação entero-hepática (Primeira Passagem), tamanho da partícula, natureza química, forma farmacêutica, efeitos do fluido gastrointestinal, metabolismo pré-sistêmico e liberação imediata ou lenta. Já quando se compara com a i.p., onde a cavidade peritoneal oferece grande superfície de absorção a partir da qual as substâncias entram rapidamente na circulação, observa-se uma menor influência desses fatores e uma absorção mais rápida do fármaco por esta via (MOURA; REYES, 2002). É possível que alguns desses fenômenos possam ter ocorridos, resultando na perda parcial ou total de alguns dos componentes do extrato bruto, principalmente na via oral, reduzindo a sua potência, refletindo assim nos resultados obtidos.

O modelo animal induzido pela administração de LPS pela via intranasal (i.n.) para estudos de inflamação, apresenta características autolimitantes, influxo de neutrofilia alveolar, massivo recrutamento de granulócitos em LBA e eliminação de fêlencia em outros órgãos (SZARKA et al., 1997; MATUTE-BELLO et al., 2008).

No nosso estudo, reduções significativas do tipo dose-dependente da migração de células totais e neutrófilos para o LBA foram observadas nos camundongos tratados com o extrato bruto hidroalcolóico de *Gomphrena globosa* no modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS. Os mecanismos envolvidos no recrutamento celular são complexos e dependem da ação de substâncias químicas geradas ou secretadas no decorrer do processo, que modificam a hemodinâmica dos vasos da microcirculação próximas à área lesada e induzem alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais nos leucócitos circulantes e em células que compõem a parede vascular e o interstício (ESCHE et al., 2005). Neste contexto, a expressão seqüencial de moléculas de adesão nos diferentes tipos celulares envolvidos no processo divide às interações célula-célula, responsáveis pela migração celular.

As citocinas e quimiocinas influenciam na maturação e diferenciação das células, tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo (TRIPATHI et al., 2008)

Linfócitos Th1 e Th2 se desenvolvem a partir de células T *helper* indiferenciadas e vários fatores contribuem para esta diferenciação como, por exemplo, o tipo de célula apresentadora de antígeno, a natureza dos sinais co-estimulatórios, via e dose de administração do antígeno e presença de citocinas (GUMY et al., 2004). A citocina inflamatória IL-12 tem características multifuncionais com propriedades que fazem a ponte entre o sistema imune inato e adaptativo, agindo como a chave reguladora das respostas imunomediadas por células, através da indução da diferenciação de células Th1. A polarização para Th1 é otimizado por interferon-gama o qual aumenta a expressão de receptores para IL-12, além de inibir o desenvolvimento de células Th2 (TRICHERI, 1995; DEL VECCHIO et al., 2007).

Vimos que o mesmo resultado ocorreu no ensaio dos níveis de IL-12 onde todos os grupos tratados com o extrato tiveram uma redução significativa dos níveis de IL-12 no LBA, sendo estas reduções do tipo dose-dependente, com possível ação de flavonóides, que devam estar na fitoquímica do extrato. . O mediador foi escolhido devido ao fato que Melo et al. (2005) mostrou que o extrato bruto da *Eleusine indica* (*Poaceae*) na dose de 400 mg/kg inibiu em 98,00 % o recrutamento de neutrófilos no pulmão de camundongos expostos ao LPS, num outro trabalho a Hipericina, o componente ativo do *Hypericum perforatum*, inibiu significativamente de forma dose-dependente a produção de IL-12 na ativação de macrófagos pelo LPS em camundongos, sendo a ação através da inibição da ativação do gene promotor da IL-12 (KANG et. al, 2001)

Os resultados obtidos no nosso modelo corroboram para a hipótese de que a ação do extrato possa estar ligada a um efeito imunomodulatório, inibindo fenômenos imunológicos que ocorram no processo de inflamação pulmonar aguda por LPS, podendo-se relacionar a ação de flavonóides, que provavelmente fazem parte dos compostos do extrato, sendo necessários mais estudos para confirmá-la. Várias plantas através de seus metabólitos possuem efeito antiinflamatório em patologias como, por exemplo, sepse, artrite e asma, sendo que na maioria dos estudos os constituintes ativos atuam modulando a inibição da síntese de moléculas de adesão ou sua ação ou as citocinas associadas às vias de sinalização intracelular e quimiocinas de forma inibitória (CALIXTO et al.,2004).

Todas as características observadas na inflamação pulmonar e a sua desregulação fisiológica são o resultado final dos eventos moleculares e celulares envolvidos na sensibilização. A inflamação pulmonar envolve o recrutamento e a

ativação de células inflamatórias e mudanças nas células estruturais do pulmão. Caracteristicamente, há expressão aumentada de diversos mediadores envolvidos na complexa trama de reações inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas, receptores e moléculas de adesão (LUKAS et al., 1999)

Os glicocorticóides podem suprimir a inflamação pelo aumento da síntese de várias proteínas antiinflamatórias, entre elas a lipocortina-1, que tem um efeito inibitório na fosfolipase- A_2 inibindo a produção de mediadores lipídicos, tais como leucotrienos, prostaglandinas e fator ativador de plaquetas. Inibem a transcrição de várias citocinas que são relevantes na resposta inflamatória e quimiocinas que atraem as células inflamatórias ao local de inflamação (DAMIANI et al, 2001). Todos os ensaios não apresentaram ação semelhante ao grupo que teve administração da dexametasona (5 mg/kg i.p), provavelmente por ser tratar de um fármaco com potente efeito antiinflamatório e antialérgico que promove um bloqueio precoce dos eventos da cascata da inflamação.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Este trabalho mostra que o extrato bruto hidroalcólico das partes aéreas de *Gomphrena globosa* pelas vias de administração utilizadas, possui constituintes ativos com atividades antiinflamatórias, tanto no modelo experimental de edema de pata pela carragenina, como da inflamação pulmonar aguda por LPS, sugerindo suas potencialidades para fins terapêuticos. Os resultados vão de encontro com as informações sobre os usos populares do gênero *Gomphrena*. Devido à importância de se descobrir novos fármacos a baixo custo para o tratamento das afecções inflamatórias, a planta em estudo vem se somar como um possível fitoterápico, porém estudos aprofundados devem ser realizados, principalmente relativos à toxicidade.

Indica-se desta forma, que futuramente seja realizado a determinação do perfil cromatográfico do extrato, com o isolamento de seus constituintes ativos e a realização de novos experimentos para melhor entendimento da ação biológica do extrato e seu uso terapêutico de forma segura.

]

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J., et al. Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. **J. Ethnopharm.**, v. 55, n.1, p.63-68, 1996.

ANDRÉ, A.C.G.M. **Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta *in natura* das variedades de *Gomphrena globosa*, 2004.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

ARTIGAS, A. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS, Part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.157, n.4, p.1332-1347, 1998.

ASHBAUGH, D.G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v.2, p. 319-323, 1967.

ATABAI, K.; MATTHAY, M. The pulmonary physician in critical care. 5: Acute lung distress syndrome: definitions and epidemiology. **Thorax**, v.57, n.5, p.452–458, 2002.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. **Ann. Rev. Immunol.**, v.15, p.675-706, 1997.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p.431–441, 2005.

BASIT, A. et al. ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 291, p.200–207, 2006.

BERNARD, G. R. et al. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. **Intens. Care Med.**, v.20, p.225-232, 1994.

BOTTING, R.M. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.57, n.6, p113–124, 2006.

BRISKIN, D.P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant. Physiol.**, v.124, p.507-514, 2000.

BURITOVA, J. et al. Concurrent reduction of inflammation and spinal Fos – LI neurons by systemic diclofenac in the rat. **Neuroscience Letter**, v.188, p.175–178, 1995.

BURLESON, B.S.; MAKI, E.D. Acute Respiratory Distress Syndrome. **J. Pharm. Pract.**, v.18, n.2, p.118–13, 2005.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, n.2, p.170-189, 2000.

CALIXTO, J.B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.**, v.70, n.2, p.93–103, 2004.

CAMPOS, H.S. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do Corticosteróide. *Rev Bras Pneumol Sanit*, v.15, n.1, p.47–60, 2007.

CARVALHO, S.M.F.; RIBEIRO, D.G. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens L.f. (Amaranthaceae)*. **Acta bot. bras.**, v. 19, n. 2, p 377-390, 2005.

CELOTTI, F.; LAUFER, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. **Pharmacol. Res.**, v.43, n.5, p.429-436, 2001.

CHANDRASEKHARAN, N.V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.99, n.15, p.13926-13931, 2002.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **J. Ethnopharm.**, v.89, n.1, p.171-175, 2003.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, n.7019, p.729–837, 2004.

DAMIANI, D. et al. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. **Pediatria (São Paulo)**, v.23, p.71-82, 2001.

DEL VECCHIO, M. et al., 2007. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. **Clin. Cancer Res.**, v.13, n.16, p.467-4685, 2007.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens for anti-inflammatory drugs. **J. Pharm. Pharmac.**, v.23, n.4, p.297-298, 1971.

DI STASI, L.C.; LIMA, C.A.H. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

GILMAN, Edward F.; HOWE, Teresa. *Gomphrena globosa*. **Fact Sheet FPS**, n.234, p.1-3, Oct. 1999. Disponível em: <<http://hort.ufl.edu/shrubs/GOMGLOA.PDF>>. Acesso em: maio 2009.

ESCHE, C.; STELATTO, C.; BECK, L.A. Chemokines: Key players in innate and adaptive immunity. **J. Invest. Dermatol.**, v.125, p.615-628, 2005.

FANK-DE-CARVALHO, S.M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L. (*Amaranthaceae*). **Acta Botânica Brasileira**, v.19, n.2, p.377-390, 2005.

FERREIRA, E.O. et al. A New Heptasubstituted (E)-Aurone Glucoside and Other Aromatic Compounds of *Gomphrena agrestis* with Biological Activity (*Amaranthaceae*). **Z. Naturforsch. C**, v.59, n.7-8, p.499-505, 2004.

FERREIRA, E.O.; DIAS, D.A. Phytochemical investigation of *Gomphrena claussenii* Moq. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.32, p.823-827, 2004.

FLOWER, R.J. Studies on the mechanism of action of anti-inflammatory drugs A paper in honour of John Vane. **Thromb. Research.**, v.110, n.5-6, p.259-263, 2003.

GALHARDO, F.P.L.; MARTINEZ, J.A.B. Síndrome do desconforto respiratório agudo. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.36, n.2-4, p.248-256, 2003.

GAVILANES, M.L. Estudo anatômico do eixo vegetativo de plantas daninhas que ocorrem em Minas Gerais. I. Anatomia foliar de *Gomphrena celosioides* Mart. (*Amaranthaceae*). **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.4, p. 882-899, 1999.

GEISER, T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury: a translational approach. **Swiss Med Wkly**, v.133, n.42-44, p.586-590, 2003.

GUMY, A.; LOUIS, J.A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **Int. J. Parasitol.**, v.34, n.4, p.433–444, 2004.

HENSON, P.M. Dampening inflammation. **Nat. Immunol.**, v.6, n.12, p.1179-1181, 2005.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

JAVAN, M. et al. Antinociceptive effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract. **J. Ethnopharm.**, v.58, n.2, p.125-129, 1997.

KANG, B.Y.; CHUNG, S.W.; KIM, T.S. Inhibition of Interleukin-12 Production in Lipopolysaccharide-Activated Mouse Macrophages by Hypericin, an Active Component of *Hypericum perforatum*. **Planta Med.**, v.67, n.4, p.364-366, 2001.

KARIMA, R. et al. The molecular pathogenesis of endotoxix shock and organ failure (Review). **Mol. Med. Today**, v.5, n.3, p.123-132, 1999.

KILPIO K.; HANNUKSELA, M. Corticosteroid allergy in asthma. **Allergy**, v.58, n.11, p.1131-1135, 2003.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v.52, nº.4, p. 498-512, 2002.

LUKACS, N.W.; OLIVEIRA, S.H.; HOGABOAM, C.M. Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? **J Clin Invest.**, v.104, n.108, p. 995-999, 1999.

MARTIN, T.R. Lung cytokines and ARDS. **Roger S. Mitchell Lecture**, v.116, n.1, p.2-8, 1999.

MATTHAY, M.A.; ZIMMERMAN, G.A. Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v.33, p.319–327, 2005.

MATUTE-BELLO, G. et al. Neutrophil Apoptosis in the Acute Respiratory Distress Syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.156, p.1969–1977, 1997.

- MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C.W.; MARTIN, T.R. Animal models of acute lung injury. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v.295, n3, p.379–399, 2008.
- MCCURDY, C.R.; SCULLY, S.S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences.**, v.78, n.5, p.476-484, 2005.
- MEDURI, G. U et al. Inflammatory Cytokines in the BAL of Patients with ARDS. **Chest**, v.108, n.5, p.1303-1314, 1995.
- MELO, G.O. et al. C-glycosylflavones from the aerial parts of *Eleusine indica* inhibit LPS-induced mouse lung inflammation. **Planta Med.**, v.71, n.44, p.362–363, 2005.
- MOURA, M.R.L.; REYES, F.G. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Rev. Nutr.**, v.15, n.2, p.223-238, 2002.
- MUSSURY, R.M. et al. Caracterização morfoanatômica de plântulas de *Gomphrena elegans* Mart. (*Amaranthaceae*). **Acta Sci. Biol. Sci.**, v.28, n.2, p.87-93, 2006.
- MUSSURY, R.M. et al. Morfoanatomia foliar comparada de *Gomphrena elegans* Mart. e *G. vaga* Mart. (*Amaranthaceae*) **Rev. Bras. Pl. Med.**, (Botucatu), v.10, n.3, p.43-50, 2008.
- NETO, A.G. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **J. Ethnopharm.**, v.96, n.1-2, p.87-91, 2005.
- NJAMEN, D.T.E. et al. Anti-inflammatory activity of erycristagallin, a pterocarpene from *Erythrina mildbraedii*. **Eur. J. Pharmacol.** v.468, n.1, p.67-74, 2003.
- OLIVEIRA, S.H.; LUKACS, N.W. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.11, p.1455-1463, 2003.
- ORTHOLAND, J.Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.8., p.271–280, 2004.
- PEREIRA, A.L.C. et al. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. **Med. Cutan. Iber. Lat. Am.**, v.35, n.1, p.35-50, 2007.
- PIANTADOSI, C. A.; SCHWARTZ, D. A. The Acute Respiratory Distress Syndrome. **Ann. Intern. Med.**, v.141, p.460-470, 2004.

POBER, J.S; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. rev. Immunol.**, v.7, n.10, p.803-815, 2007.

POSADAS I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.**, v.142, n.2, p.331–338, 2004.

REN, Y. et al. Apoptotic Cells Protect Mice against Lipopolysaccharide-Induced Shock. **J. Immunol.**, v.180, p. 4978–4985, 2008.

REYNOLDS, H.Y. Lung inflammation: normal host defense or a complication of some diseases. **Ann. Rev. Med.**, v.38, p.295-323, 1987.

ROWLEY, A.F. et al. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. **J. Exp. Biol.**, v.208, n.1, p.3-14, 2005.

RYAN, G.B.; MAGNO, G. Acute inflammation. **Am. J. Pathol.**, v.86, p.185-276, 1977.

SALVADOR, M.J. et al. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adult plants extracts from *Alternanthera maritima* (*Amaranthaceae*). **Braz. J. Microbiol.**, v.34, n.1, p.131-136, 2004.

SANTANGELO, C. et al. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Ann. Ist. Super Sanita**, v.43, n.4, p.394-405, 2007.

SCHIFFMANN, E. LEUKOCYTE CHEMOTAXIS. **Ann. Rev. Physiol.**, v.44, p. 553-558, 1982.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end . **Nat. Immunol.**, v.6, n.12, p.1191-1197, 2005.

SOUZA, A.B. et al. Lung tissue remodeling in the acute respiratory distress syndrome. **J. Pneumologia**, v.29, n.4, p.235-245, 2003.

SPRINGER, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Ann. Rev. Physiol.**, v.57, p.827-872, 1995.

SUGISHITA, E.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **J. Pharmacobiodyn.**, v.8, n.4, p.565–575, 1981.

SURALKAR, A.A. et al. In-Vivo Animal Models for Evaluation of Anti-inflammatory Activity. *Lasted Rev.*, v.6, n.2, 2008. DOI: <http://www.pharmainfo.net/reviews/vivo-animal-models-evaluation-anti-inflammatory-activity>.

SZARKA, R.J. et al. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. **J. Immunol. Met.**, v.202, n.1, p. 49-57, 1997.

TASAKA, S. et al. Effect of CD14 Blockade on Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.29, n.2, p.252–258, 2003.

TEGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines and atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. **Physiol. Rev.**, v.86, n.2, p.515–581, 2006.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n.6917, p.853-859, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Ann. Rev. Immunol.**, v.13, p.251–276, 1995.

TRIPATHI, S. et al. Ginger extract inhibits LPS induced macrophage activation and Function. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.8, n.1, 2008.

UETRECHT, J. Role of Animal Models in the Study of Drug-induced Hypersensitivity Reactions. **AAPS J.**, v.7, n.4, p. E914-E921, 2006. DOI: 10.1208/aapsj070489.

VAN ARMAN, C.G.; BEGANY, A.J.; MILLER, L.M.; PLESS, A.H. Some details of the inflammations caused by yeast and carrageenin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.150, n.2, p.328–334, 1965.

VAN, W.J. Phytobusinenin requires social chemistry. **Phytochemistry**, v.55, p.93-95, 2000.

VANE, J.R.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB J.**, v.1, n.2, p.89-96, 1987.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. The mechanism of action of aspirin. **Thromb Res.**, v.110, n.5-6, p.255-258, 2003.

WARD, P.A.; HUNNINGHAKE, G.W. Lung inflammation and fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.157, n.4, p.123–129, 1998.

WARE, L.B.; MATTHAY, M.A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med.**, v.342, n.7, p.1334-1349, 2000.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Med.**, v.11, p.544-547, 1962.

YEH, C.C. et al. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. **Life Sciences**, v.80, n.20, p.1821-1831, 2007.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

ANEXO A Comitê de Ética em Pesquisa da Univap

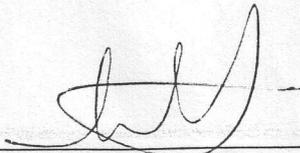
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A035/2006/CEP, intitulado “*Efeito do tratamento com extratos de Páffia glomerata em hiperreatividade pulmonar induzida por LPS em camundongo*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wellington Ribeiro, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 19 de setembro de 2006.



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP