

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOSÉ ALEX CARVALHO DE FARIAS

**Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato hexânico
obtido a partir das cascas e das folhas de *Clusia nemorosa*
Mey**

Maceió/AL
2010

JOSÉ ALEX CARVALHO DE FARIAS

Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato hexânico obtido a partir das cascas e das folhas de *Clusia nemorosa* Mey

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientador: Profº. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

Maceió/ AL
2010

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

F224a Farias, José Alex Carvalho de.
Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato hexânico obtido a partir das cascas e das folhas de *Clusia nemorosa* Mey / José Alex Carvalho de Farias, 2010.
69 f. : graf. e tabs.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2010.

Bibliografia: f. 61-69

1. Plantas medicinais. 2. *Clusia nemorosa*. 3. Agentes Antiinflamatórios. 4. Alergia. I. Título.

CDU: 615.2



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno José Alex Carvalho de Farias, intitulado: "Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato hexânico obtido a parti da casca e da folha de *Clausia nemoroso* Mey", orientado pelo Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 26 de março de 2010.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram o candidato aprovado

Banca Examinadora:

Maria das Graças M.O. Henriques

Profª. Dra. Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques - Fiocruz

Lúcia Maria Conserva

Profª. Dra. Lúcia Maria Conserva - UFAL

Salete Smaniotto

Profª. Dra. Salete Smaniotto -UFAL

Dedico esta conquista ao meu saudoso pai, **José Manoel de Farias** (*in memoriam*). Pois demonstrou-me a importância da honestidade e a capacidade de superar as dificuldades com muito trabalho.

AGRADECIMENTOS

Este espaço considero ser um dos mais importantes, por isso, agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e a fé espiritual que a mim foi concedida. Sem ele nada existiria.

Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto pela paciência e confiança depositada em mim. Um verdadeiro exemplo de amor pelo que faz.

A todos os amigos do laboratório de Biologia Celular e Molecular do ICBS/UFAL, em especial a Juliane, Bety, Jamyle, Isabela, Ozi e Leila, que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

Aos professores Renato e Daniel, pelo estímulo em acreditar no meu potencial.

A professora Dra Lucia Maria Conserva, pela co-orientação, por fornecer os extratos e pelas explicações essenciais para este estudo.

Ao corpo docente do Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde e aos colegas que estão também alcançando esta conquista.

A coordenadora da Pós-Graduação, Dr. Salete Smaniotto, sempre atenciosa e amiga, assim como as meninas da secretaria. Meu muito obrigado.

Aos funcionários do ICBS, em especial ao pessoal do biotério.

A minha esposa Thycia e o meu filho Pedro Lucas que suportaram ao meu lado os momentos de abdicação e luta que tivemos que passar, o meu muito obrigado.

Minha mãe, exemplo de trabalho e competência naquilo que faz, e a minha irmã, meu muito obrigado pelo incentivo e apoio, não seria nada sem vocês. A todos os tios, tias, primos e primas, e principalmente aos meus avôs Milton e Coralia, pela compreensão e ajuda em todos os momentos da minha vida.

Ao meu sogro Rosevelt e a minha sogra Edna, que contribuíram na criação do meu filho, para que eu pudesse realizar este sonho, meu muito obrigado.

A instituição Cesmac, na pessoa do professor Mauro Martins, pelo apoio na realização desta etapa profissional. A todos os meus amigos e colegas do Cesmac, em especial a Fernando e Johnson, por estarem sempre prontos a me ouvir.

A todos do laboratório da Farmanguinhos-Fiocruz, em especial a Dr. Maria das Graças, André Candéa, Fernando, Fausto. Meu muito obrigado.

A todos os professores que farão parte da banca por terem aceitado o convite, minha gratidão.

A CAPES, FAPCAL e CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, meu muito obrigado a todos que contribuíram para esta vitória.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	6
AGRADECIMENTOS	7
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIações	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 A resposta inflamatória.....	19
3.2 Aspectos gerais da Inflamação alérgica.....	24
3.3 Terapia antiinflamatória.....	26
3.4 Plantas medicinais e fármacos derivados de plantas.....	28
3.5 Família Clusiaceae, o gênero <i>Clusia</i> e a espécie <i>Clusia nemorosa</i> Mey.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Animais.....	34
4.2 Material da planta e preparação dos extratos.....	34
4.3 Pleurisia induzida por carragenina.....	36
4.4 Quantificação de TNF-alfa.....	36
4.5 Obtenção de neutrófilos humanos.....	37
4.6 Quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i>	37
4.7 Avaliação de apoptose por citometria de fluxo.....	38
4.8 Pleurisia Alérgica induzida por antígeno.....	38
4.9 Avaliações dos leucócitos.....	39
4.10 Quantificação do RNA mensageiro de proteínas inflamatórias.....	39
4.11 Formação de granuloma por implante de algodão.....	40
4.12 Análise Estatística.....	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Efeito do extrato hexânico da casca e da folha de <i>C. nemorosa</i> sobre a pleurisia induzida por carragenina em camundongos.....	41
5.2 Efeito do extrato hexânico da casca e folha de <i>C. nemorosa</i> sobre a ativação de neutrófilos humanos <i>in vitro</i>	45
5.3 Efeito do extrato hexânico da casca e folha de <i>C. nemorosa</i> sobre a pleurisia induzida por ovalbumina em camundongos ativamente sensibilizados...	48
5.4 Efeito do extrato hexânico da casca e folha de <i>C. nemorosa</i> no modelo de inflamação crônica induzido por implante de algodão em camundongos.....	52
6 DISCUSSÃO	53

7 CONCLUSÕES.....	60
8 REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do EHC e HEF sobre a pleurisia induzida por carragenina.....	42
Figura 2. Efeito do EHC e EHF sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos <i>in vitro</i> após estímulo por KC.....	44
Figura 3. Efeito do EHC e HEF sobre a viabilidade de neutrófilos humanos.....	46
Figura 4. Efeito do EHC ou EHF sobre a eosinofilia induzida por antígeno em animais alérgicos.....	48
Figura 5. Efeito do EHC sobre a expressão de RNAm nas células recolhidas do lavado pleural.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do tratamento com o EHCn sobre a produção de TNF- α em animais estimulados por carragenina.....	43
Tabela 2. Efeito do tratamento com o EHCn sobre a formação do tecido granuomatoso induzido por discos de algodão.....	51

LISTA DE ABREVIÇÕES

- APC – “antigen-presenting cells” – células apresentadoras de antígeno
- ECP – “eosinophil cationic protein” – proteína catiônica do eosinófilo
- EDTA – ácido etilenodiaminatetraacético
- ELISA – Ensaio enzimático de imunoadesão ligado à enzima
- EPM – erro padrão da média
- FcεRI – receptor de alta afinidade para IgE
- GM-CSF – “granulocyte-macrophage-colony stimulating factor” – fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
- IL – interleucina
- ICAM – “intercellular adhesion molecule” – Molécula de adesão intercelular
- Ig – imunoglobulina
- i.p. – intraperitoneal
- i.t. – intratorácica
- kg – quilograma
- LT – leucotrienos
- µg – micrograma
- µL – microlitro
- MBP – “major basic protein” – proteína básica principal
- min – minutos
- NF-κB – “nuclear factor kappa B” – fator nuclear kappa B
- Ova – ovoalbumina
- PAF – “platelet-activating factor” – fator de ativação plaquetária
- PG – prostaglandina
- rpm – rotações por minuto
- EHC – Extrato Hexânico de *Clusia nemorosa*
- Th – “T helper” – linfócito T auxiliar
- TNF – “tumor necrosis factor” – fator de necrose tumoral
- VCAM – “vascular cell adhesion molecule” – molécula de adesão celular vascular
- CXCL1 – quimiocina 8 ou interleucina – 8
- CCL11 – eotaxina (quimiocina)

RESUMO

Clusia nemorosa, conhecida popularmente como “pororoca”, é empregada na medicina popular como antiinflamatório e analgésico, porém não há registros científicos que confirmem esta observação. Assim, motivados por esta informação, no presente estudo avaliamos o efeito antiinflamatório do extrato hexânico obtido da casca e da folha de *Clusia nemorosa* utilizando diferentes modelos experimentais. No modelo de inflamação aguda induzida por carragenina, os extratos da casca e da folha foram capazes de inibir o acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos no tempo de 4 h. Além disso, ambos os extratos reduziram de maneira significativa os níveis de TNF-alfa no fluido pleural de animais estimulados com carragenina. Entretanto, *in vitro* apenas o extrato hexânico da folha foi capaz de demonstrar um efeito direto sobre estas células por inibir a quimiotaxia de neutrófilos humanos purificados estimulados por CXCL1. Esta inibição na motilidade celular parece não ser relacionada a eventos de morte, pois a análise realizada por citometria de fluxo revelou que a incubação dos neutrófilos humanos com os extratos não foi capaz de interferir com a viabilidade destas células. No modelo de inflamação alérgica, somente o extrato hexânico da casca suprimiu o recrutamento de eosinófilos para o espaço pleural após desafio antigênico em animais ativamente sensibilizados no tempo de 24 h. Análise da expressão gênica de proteínas relacionadas ao processo alérgico (IL-5 e CCL11) revelou que o extrato da casca também inibiu de maneira significativa a produção de RNA mensageiros para IL-5 e CCL11. No modelo de inflamação crônica com formação de granuloma induzido por implantes de algodão, observamos que o extrato hexânico da casca foi o que apresentou maior capacidade de inibição da formação do tecido granulomatoso. Assim, este conjunto de resultados sustenta o uso popular do extrato obtido de *Clusia nemorosa*, além de indicar que diferentes partes (casca e folha) desta planta podem torna-se uma potencial fonte de substâncias com propriedades antiinflamatórias.

Palavras-chave: *Clusia nemorosa*, inflamação, alergia.

ABSTRACT

Clusia nemorosa, popularly known as "pororoca" is used in folk medicine as anti-inflammatory and analgesic. However, until the moment, do not has scientific records to confirm this observation. Thus, motivated by this information, in the present study we evaluated the anti-inflammatory effect of the hexane extract obtained from the bark and leaf of *Clusia nemorosa* using different experimental models. In the model of acute inflammation induced by carrageenan, the extract of the bark and leaf were able to inhibit the neutrophil accumulation in the pleural cavity after 4 h of stimulation. In addition, both extracts significantly reduced the levels of TNF-alpha in pleural fluid of animals stimulated with carrageenan. However, in the *in vitro* studies, only the hexane extract of the leaf was able to demonstrate a direct effect on these cells by inhibiting the chemotaxis of purified human neutrophils stimulated with CXCL1. This inhibition in the cell motility do not seems to be related to events of death, because the analysis by flow cytometry revealed that incubation of human neutrophils with the extracts was not able to interfere with the viability of these cells. In the model of allergic inflammation, only the hexane extract of the bark suppressed the recruitment of eosinophils into the pleural cavity 24 h after antigen challenge in actively sensitized animals. Analysis of gene expression of proteins associated with allergies (IL-5 and CCL11) showed that the bark extract also significantly inhibited the production of messenger RNA for IL-5 and CCL11. In the model of chronic inflammation with granuloma formation induced by cotton implants, we observed that the hexane extract of the bark showed the greatest ability to inhibit the formation of granulomatous tissue. Thus, this set of results supports the popular use of the extract obtained from *Clusia nemorosa*, and indicates that different parts (bark and leaf) of this plant can become a potential source of substances with anti-inflammatory properties.

Key words: *Clusia nemorosa*, inflammation, allergy.

1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório pode ser definido como uma resposta dos tecidos vascularizados contra estímulos lesivos, estando acompanhado de sinais clínicos característicos como calor, rubor, edema, dor e perda da função. Historicamente, a inflamação tem sido denominada aguda ou crônica, dependendo da persistência da lesão, dos sintomas clínicos e da natureza da resposta inflamatória (BAUTISTA, 2003). É sabido que as doenças alérgicas são consideradas desordens inflamatórias capazes de causar, em indivíduos pré-dispostos, respostas imunes locais ou sistêmicas levando em alguns casos ao óbito (LEUNG, 1998). No caso de respostas de hipersensibilidade Tipo 1 estas alterações são causadas a partir de um contato primário com antígenos presentes no meio ambiente gerando respostas imunes específicas induzindo, na maioria dos casos, a produção de anticorpos do tipo IgE. Após re-exposição, o antígeno interage com estas imunoglobulinas, fixado na superfície de células alvo, resultando na liberação de um vasto perfil de mediadores responsáveis pelo aparecimento do quadro alérgico (PAWANKAR, 2007). Diferentes autores apontam para um aumento na prevalência das alergias, sobretudo nos últimos 30 anos, com destaque para a asma, rinite e dermatite atópica (LARCHÉ et al., 2003; COOKSON, 2004). Estas doenças alérgicas constituem um problema comum de saúde nas sociedades ocidentais, proporcionando uma redução na qualidade de vida e desempenho profissional principalmente nos países em desenvolvimento (SHAKOORY et al., 2004). Dentre as terapias de escolha para a inflamação destacam-se os glicocorticóides e os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais. No entanto, levando-se em conta seus efeitos colaterais é de grande relevância a busca por novas estratégias terapêuticas (SILVA, 2006).

Os produtos naturais mostram-se como uma promissora fonte de obtenção e desenvolvimento de modernas estratégias terapêuticas. Por este e outros motivos, pesquisas que buscam conhecer a atividade farmacológica de interesse nos extratos e/ou frações de produtos naturais são de extrema importância (CALIXTO et al., 2003). Muitos fármacos apresentam estruturas químicas relacionadas a um produto natural extraído de alguma espécie botânica de uso consagrado na medicina popular (BASSO et al., 2005). Na busca por agentes

naturais bioativos, um dos passos fundamentais é a utilização de ensaios biológicos que possam funcionar como guias na seleção de substâncias ativas. Diferentes estudos farmacológicos com produtos obtidos de plantas da flora brasileira revelam o potencial terapêutico destas espécies em modelos que amenizam o dano inflamatório provocado por diferentes estímulos (AGRA et al., 2008).

Vários membros da família Clusiaceae exibem uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo o gênero *Clusia*, na qual compreendem aproximadamente 460 espécies (JUDD et al., 1999). Desta família foi isolada mais de uma centena de componentes com distintas atividades biológicas, incluindo substâncias com propriedades antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiviral e antidepressiva (BITTAR et al., 2000). No entanto, a espécie *Clusia nemorosa* apesar de ser usada na medicina popular em diversos processos inflamatórios e na dor, não existe nenhum relato na literatura científica que comprove sua atividade antiinflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiinflamatória do extrato hexânico obtido das cascas e das folhas de *Clusia nemorosa* utilizando diferentes modelos experimentais.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito antiinflamatório do extrato hexânico obtido das cascas e das folhas de *C. nemorosa* utilizando modelo de pleurisia induzido por carragenina.
2. Avaliar a influência do extrato hexânico obtido das cascas e das folhas de *C. nemorosa* sobre a ativação de neutrófilos *in vitro*.
3. Avaliar o efeito antialérgico do extrato hexânico obtido das cascas e das folhas de *C. nemorosa* no modelo de pleurisia alérgica.
4. Avaliar a influência do extrato hexânico obtido das cascas e das folhas de *C. nemorosa* no modelo de inflamação crônica induzido por implante de algodão.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A resposta inflamatória

A primeira descrição das características clínicas da inflamação data de aproximadamente 3000 a.C., mas somente no século I d.C., o escritor romano Celsius foi o primeiro a listar os quatro sinais cardinais da inflamação, rubor, tumor, calor, dor. A perda de função, quinto sinal clínico, foi adicionado posteriormente por Virchow. Em 1793, John Hunter, propôs o conceito de que a inflamação não é uma doença, mas uma resposta sem especificidade, com objetivos salutares ao hospedeiro (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; COTRAN et al., 2006).

A inflamação é uma resposta a estímulos químicos, físicos ou biológicos e tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes e potencializar o reparo tecidual (BAUTISTA, 2003). Vários são os componentes envolvidos nesta resposta inflamatória, tais como fluido e as proteínas do plasma, as células circulantes (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas), os vasos sanguíneos e os componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo (mastócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, proteínas fibrosas estruturais, glicoproteínas de adesão e proteoglicanos) (KUMAR et al., 2008).

Em geral, costuma-se classificar a inflamação em aguda e crônica de acordo com as características morfológicas observadas. Dessa maneira, uma resposta inflamatória aguda é de curta duração e, além de uma reação local, ocorre também uma reação sistêmica, chamada de resposta de fase aguda, caracterizada por febre, produção de diversos hormônios, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. A resposta local se inicia quando o dano tecidual e endotelial desencadeia vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular resultando na exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e na migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos (FLOWER e PERRETTI, 2005). A inflamação crônica é caracterizada por longa duração e está associada com a presença e ativação de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, necrose tissular e estímulo a proliferação de fibroblastos que culmina na fibrose tecidual. A inflamação termina quando o estímulo é eliminado e os mediadores secretados são destruídos ou dispersos. Além disso, merece ser mencionado

também que existem mecanismos antiinflamatórios ativos que modulam a resposta e evitam que ela seja exacerbada (GRUNDY, 2003).

As reações vasculares e celulares da inflamação são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas ou de células plasmáticas e são produzidos ou ativados pelo estímulo inflamatório. Esses mediadores agem solitariamente, em conjunto ou em seqüência, amplificando a resposta inflamatória e influenciando sua evolução (TREPPELS, ZEIHNER e FICHTLSCHERER, 2006).

A vasodilatação e a exsudação plasmática são acompanhadas pela marginação de leucócitos, sua adesão e migração. A passagem dos leucócitos do compartimento vascular para o tecido extravascular é guiada por interações adesivas específicas entre os leucócitos e as células endoteliais. A seqüência de eventos envolvidos nestes processos compõe a teoria do recrutamento leucocitário, que envolve marginação e captura dos leucócitos livres circulantes do lúmen vascular; rolagem, ativação, firme adesão e extensão na superfície do endotélio; com subsequente movimento através da barreira das células endoteliais, também chamado de diapedese; passo seguido da migração quimiotática dos leucócitos (KELLY, HWANG e KUBES, 2007) (Ilustração 1).

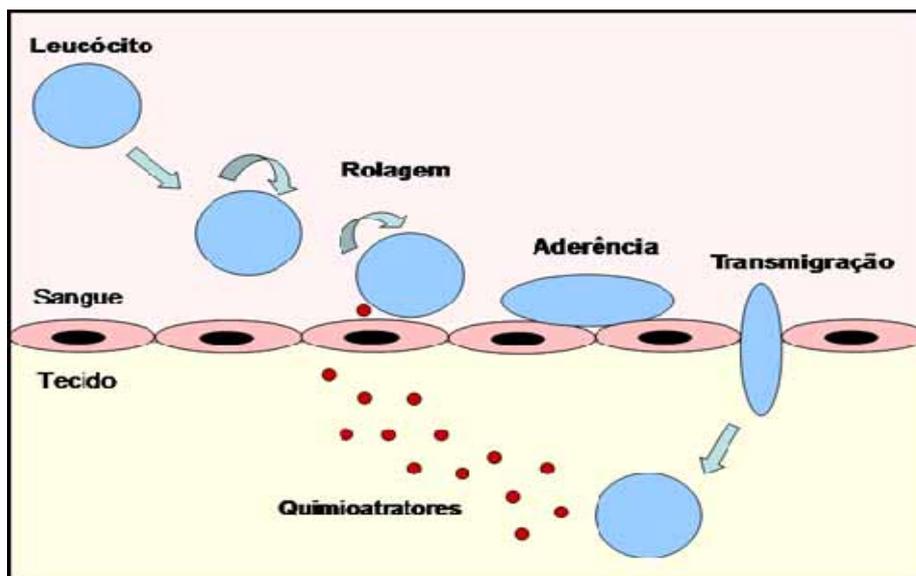


Ilustração 1. Representação esquemática da migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o tecido lesionado. (retirado de Coutinho, Muzitano e Costa, 2009)

O pré-requisito para esses passos de mobilização leucocitária é a ativação da monocamada de células endoteliais por sinais derivados do tecido. Estes induzem a expressão de moléculas de adesão e a secreção de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais (SPRINGER, 1994). O extravasamento de leucócitos para os tecidos é dependente da existência de diferentes famílias de moléculas de adesão e seus respectivos receptores, tanto em leucócitos como em células endoteliais. Assim, a mobilização das células inflamatórias para os locais da lesão envolve interações combinadas de vários tipos de mediadores solúveis que desempenham um papel essencial na coordenação do processo inflamatório. Desta maneira, após o extravasamento, os leucócitos se locomovem ao longo de um gradiente químico em direção ao local da lesão, evento denominado de quimiotaxia (SHERWOOD e TOLIVERKINSKY, 2004).

Tanto substâncias endógenas como exógenas podem agir como estímulos quimiotáticos, alguns exemplos de substâncias exógenas que funcionam como agentes quimiotáticos são os produtos bacterianos, como os peptídeos N-formilados. Dentre as substâncias endógenas estão os componentes do sistema complemento, produtos da via da lipooxigenase e as quimiocinas (NOURSHARGH e MARELLI-BERG, 2005).

As citocinas são mediadores protéicos com grande potencial modulador sobre diferentes células de defesa do organismo. Como exemplos destas proteínas podem ser destacados as interleucinas, interferon e fatores de crescimento e diferenciação. Estes mediadores têm um importante papel regulador sobre o início, a manutenção e o término das reações inflamatórias. Entre as citocinas mais conhecidas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), a interleucina 1 (IL-1) e a interleucina 6 (IL-6) são vistas como as mais importantes, devido aos seus papéis na patofisiologia de muitas respostas inflamatórias agudas e crônicas, bem como, nos processos de reparo (ALWANI et al., 2006). O TNF-alfa é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por fagócitos mononucleares, mas pode ser produzido por outras células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, células NK, e mastócitos) ou não-inflamatórias (endotélio) em resposta a diferentes estímulos. Esta proteína interage com dois diferentes receptores externos, o receptor 1 de TNF-alfa (TNF-R1), ou p55, e o receptor 2 de TNF-alfa (TNF-R2), ou

p75. Embora os domínios extracelulares do TNF-R1 e do TNF-R2 sejam homólogos e manifestam semelhante afinidade para o TNF-alfa, as regiões citoplasmáticas dos dois receptores são distintas e medeiam diferentes eventos intracelulares. Mesmo que muitos tipos celulares e tecidos primários expressem ambas as isoformas, a maioria das atividades biológicas do TNF-alfa são mediadas através do TNF-R1. Dentre os efeitos inflamatórios induzidos pelo TNF-alfa, destaca-se: ativação do fator de transcrição NF- κ B, indução da expressão endotelial de ICAM-1 e VCAM-1, ativação de neutrófilos e fagócitos mononucleares, serve como fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (MAZZON e CUZZOCREA, 2007).

As quimiocinas constituem uma grande família de proteínas de baixo peso molecular (8-12 kDa). Elas são reconhecidas por seus efeitos de ativação e diferenciação celular, por estimular o movimento dos leucócitos e regular sua migração do sangue para os tecidos. Atualmente, tem sido reconhecido seu papel em muitos processos biológicos tais como angiogênese, produção de colágeno, hematopoiese, organogênese, proliferação celular, polarização linfocitária, apoptose e metástase (LUKACS, 2001). As quimiocinas dividem-se em quatro subgrupos com base no número e no espaçamento entre os seus dois primeiros resíduos de cisteína conservados na posição amino-terminal. São classificadas como CC, CXC, CX₃C e C; onde "X" é um aminoácido (ROSSI e ZLOTNIK, 2000). Os receptores de quimiocinas são classificados da mesma maneira que as quimiocinas: receptores CC (CCRs) que reconhecem quimiocinas CC e receptores CXC (CXCRs) que reconhecem quimiocinas CXC. Eles são expressos de uma forma variável entre os diferentes tipos de leucócitos e preferencialmente sinalizam através da classe de proteínas-G heterotriméricas. As quimiocinas são capazes de interagir com seus receptores diferentemente expressos em tecidos sob condições fisiológicas ou patológicas, agindo em combinação com diferentes receptores de adesão para controlar a migração dos leucócitos vasculares em direção ao tecido-alvo (JOHNSTON e BUTCHER, 2002; MELO et al., 2007).

A ativação celular leva à rápida remodelação dos lipídios de membrana para gerar mediadores lipídicos biologicamente ativos. Estes funcionam como sinais intracelulares ou extracelulares que afetam diversos processos biológicos, incluindo homeostasia e inflamação (BURIAN e GEISLINGER, 2005). Esses mediadores são formados rapidamente e exercem seus efeitos no local, degradando-se espontaneamente ou sendo destruídos por enzimas. O ácido aracdônico (AA), um ácido graxo poliinsaturado derivado da dieta ou da conversão do ácido graxo essencial ácido linoléico, é formado a partir dos fosfolípídeos de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) (LI e CHEN, 2005). Duas classes principais de enzimas são responsáveis pela síntese dos metabólitos do AA: as ciclooxigenases (COXs), representadas pelas isoformas COX-1, chamada de constitutiva, devido a sua produção constante e ampla distribuição nos tecidos, e pela COX-2 considerada como induzida, uma vez que apresenta uma expressão restrita, sendo regulada por estímulos inflamatórios e/ou proliferativos e exerce efeito preponderante nas respostas inflamatórias, iniciando a biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos (prostanóides). A segunda classe de enzima, lipooxigenases (LOX), atuam na biossíntese de leucotrienos, lipoxinas e outros compostos (LT) (ALWANI et al., 2006; MICHELIN et al., 2006).

Os prostanóides mais importantes na inflamação são: PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂ (prostaciclina) e TXA₂. A prostaciclina possui ação vasodilatadora, além de potencializar os efeitos quimiotáticos e aumentar a permeabilidade de outros mediadores. As prostaglandinas PGE₂, PGD₂ e PGF₂ também são vasodilatadoras, o que fazem com que contribuam para exacerbar o edema tecidual. Além disso, as prostaglandinas também estão envolvidas na patogenia da dor e da febre durante a inflamação, por exemplo, PGE₂ torna a pele hipersensível a estímulos dolorosos. Por sua vez, LTB₄, principal leucotrieno envolvido no processo inflamatório, exerce potente atividade quimiotática para leucócitos, eosinófilos e monócitos, promovendo a migração destes tipos celulares para o local afetado. Uma vez no sítio, os leucotrienos ativam as células da série branca, promovendo a desgranulação e a produção de superóxidos, que contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação. Em adição, os leucotrienos C₄, D₄ e E₄ (LC₄, LD₄ e LE₄) apresentam importante participação nos eventos vasculares por aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos (ABBAS et al., 2008; SAUTEBIN, 2000).

3.2 Aspectos gerais da Inflamação alérgica

O termo alergia foi usado inicialmente por Von Pirquet (1907) para descrever a habilidade de indivíduos em desenvolver respostas biológicas alteradas após repetidos contatos com fatores ambientais, respostas estas que se apresentavam de grande incidência e com potencial para causar importante grau de comprometimento. As alergias são desordens que acometem cerca de 20% a 30% da população humana em países desenvolvidos, estando entre as doenças crônicas mais comuns (MATYSIAK-BUDNIK e HEYMAN, 2002).

Em 2006, o estudo internacional da asma e das doenças alérgicas na infância, mostrou dados epidemiológicos destas doenças em diferentes partes do mundo. O Brasil está entre os países que estão no topo na prevalência de asma ativa, e dos sintomas de rinites e eczemas em crianças na idade escolar e nos adolescentes (SOLE et al., 2006).

A alergia é caracterizada por um aumento na capacidade de linfócitos B sintetizarem imunoglobulinas do isotipo E (IgE) contra antígenos que entram no organismo através da inalação, ingestão ou penetração pela pele, conduzindo a uma hiperatividade imunológica e a uma inflamação alérgica (LARCHÉ et al., 2003; COOKSON, 2004). Esses antígenos são considerados inócuos, mas capazes de induzir quadros patológicos em indivíduos sensibilizados. Assim, a alergia é capaz de promover, em indivíduos pré-dispostos, respostas inflamatórias locais ou sistêmicas, envolvendo mecanismos complexos de interação entre diferentes tipos celulares e conseqüente liberação de um vasto perfil de mediadores químicos (BOCHNER e BUSSE, 2004; SHAKOORY et al., 2004).

Os linfócitos T $\alpha\beta$ CD4⁺ participam das reações alérgicas secretando preferencialmente citocinas como IL-2, IL-4, IL-5 e IL-13, demonstrando um perfil Th2. Estas citocinas possuem um papel imprescindível para o desenvolvimento e manutenção do quadro asmático, regulando a síntese de IgE, produção de mediadores, maturação e ativação de mastócitos e basófilos, e promovendo o recrutamento de outros tipos celulares (HERRICK e BOTTOMLY, 2003).

A fase de sensibilização alérgica inicia-se com a secreção de IgE por linfócitos B que irão se ligar aos receptores $Fc\epsilon R1$ de alta afinidade expressos na membrana de mastócitos presentes nos tecidos, e quando há ligação cruzada do antígeno com anticorpos adjacentes, estes mastócitos desgranulam liberando mediadores como histamina, serotonina, mediadores lipídicos e citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, caracterizando a resposta alérgica aguda (LARCHÉ et al., 2003; COOKSON, 2004). O recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório caracteriza a fase tardia da inflamação alérgica, evento modulado por vários mediadores quimiotáticos, dentre eles a IL-5 tem um papel de destaque, pois além de induzir diferenciação e maturação destas células na medula óssea, favorece a atividade efetora e sobrevivência dos eosinófilos (FERREIRA, 2003; ROTHENBERG e HOGAN, 2006). Estudos demonstram que a IL-5 juntamente com um importante agente quimiotático específico, CCL11 (eotaxina), atrai os eosinófilos de modo seletivo para o tecido inflamado sem afetar outros leucócitos na medula óssea. A ativação dos eosinófilos leva à secreção de proteína básica maior, proteína catiônica eosinofílica, peroxidase eosinofílica, diversos mediadores inflamatórios (PAF, LTC_4 , etc.) e de citocinas (GM-CSF, $TNF-\alpha$, IL-3, IL-5, entre outros), favorecendo a amplificação da resposta imune local e podendo levar a um importante dano tecidual (LAMPIENEN et al., 2004; ROTHENBERG e HOGAN, 2006) (Ilustração 2).

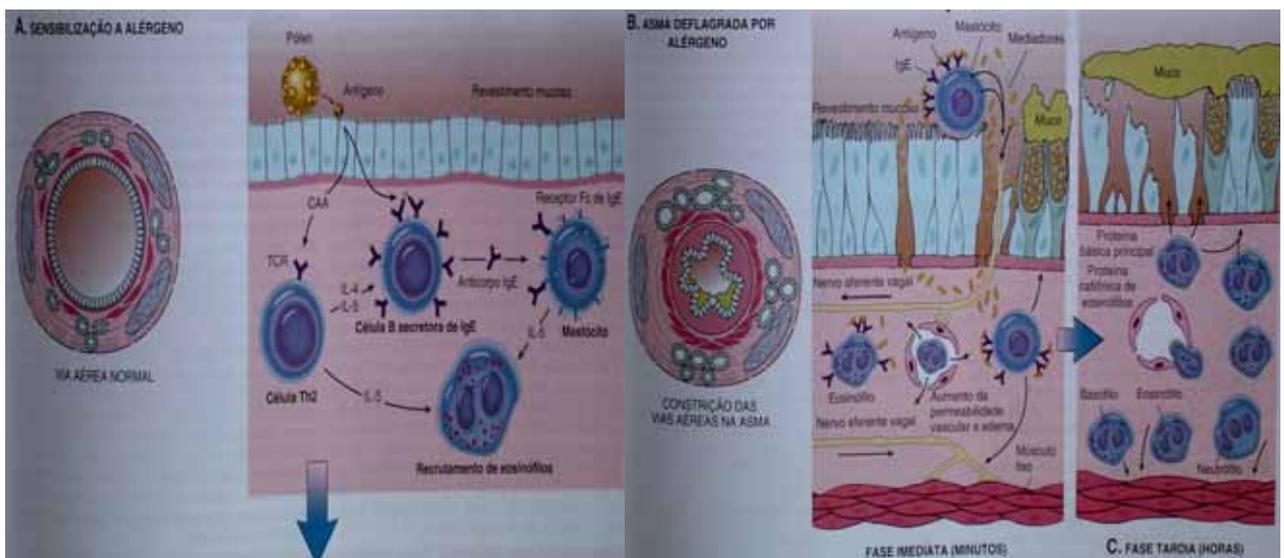


Ilustração 2: Representação das fases inicial e tardia da resposta inflamatória alérgica. (retirado de Kumar et al., 2008)

3.3 Terapia antiinflamatória

A homeostasia e o estado saudável são restabelecidos quando a inflamação é limitada por respostas antiinflamatórias que são redundantes, rápidas, reversíveis, localizadas, adaptativas a mudanças na origem e integradas ao sistema nervoso (NATHAN e LIDDLE, 2002). Quando as forças de contenção intrínsecas falham ou não são suficientes faz-se uso de auxiliares extrínsecos, substâncias que quando administradas ao organismo possuem ação antiinflamatória e atuam na recuperação da homeostasia corpórea.

Dentre as principais terapias antiinflamatórias, os antiinflamatórios não esteroidais (AINE) têm a aplicação mais ampla. Os AINEs atualmente agem, em sua maioria, inibindo a atividade das isoformas 1 e 2 da COX (BURIAN e GEISLINGER, 2005). Exemplos de AINEs incluem o ácido acetil salicílico, protótipo da classe introduzido na medicina em 1899, que acetila irreversivelmente a COX; e vários outros tipos de ácidos orgânicos, como o ibuprofeno, derivado do ácido propiônico; indometacina, da classe dos derivados do ácido acético; e os ácidos enólicos, como o piroxicam (BELVISI, 2004; HILÁRIO, TERRERI e LEN, 2006).

O fato da COX-1 ser expressa de modo constitutivo leva a crer que a sua inibição pelos AINEs não seletivos seja base dos efeitos colaterais graves observados com esses inibidores, principalmente sobre o trato gastrointestinal. Assim, a inibição seletiva da COX-2 está envolvida na estratégia terapêutica de escolha para o tratamento de condições inflamatórias (ALWANI et al., 2006). A expressão da COX-2 é induzida por estimulantes inflamatórios como o lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas (LPS), citocinas proinflamatórias (TNF-alfa) e fatores de crescimento; enquanto sua expressão é inibida por glicocorticóides e citocinas antiinflamatórias (ALWANI et al., 2006). O rofecoxib e o celecoxib, fármacos da classe designada coxibs, são exemplos de inibidores seletivos da COX-2 (RANG, 2007).

Interferir com a habilidade das células inflamatórias de aderirem e migrarem através do endotélio durante certos estados patológicos pode ser benéfico. Desta forma, um dos melhores efeitos do tratamento com os AINEs e outros antiinflamatórios, como os glicocorticóides, é limitar a ativação e o recrutamento de leucócitos (WAGNER e ROTH, 1999).

Glicocorticóides são mediadores antiinflamatórios endógenos potentes, liberados em minutos em resposta ao estresse e à lesão tecidual para controlar a severidade da resposta inflamatória, atuando contra reações inflamatórias potencialmente exageradas produzidas pelo hospedeiro. A ação dos glicocorticóides se dá através de receptores nucleares, localizados sob a forma nativa no citoplasma. A ligação do glicocorticóide ao receptor o ativa e o complexo glicocorticóide-GR dirige-se para o núcleo, onde reage na forma de dímeros, com os elementos responsivos aos glicocorticóides, que são seqüências específicas de DNA dentro das regiões reguladoras dos genes afetados, esta ligação leva à ativação ou à inibição da transcrição de genes-alvo. Dessa forma, há a inibição da produção de mediadores inflamatórios pelos leucócitos, bem como das respostas das células-alvo a estes mediadores (GILROY et al., 2004).

É conhecido que as terapias para o tratamento de doenças de origem inflamatória apresentam efeitos indesejáveis, por exemplo, esteróides podem causar osteoporose e deficiência na cicatrização, enquanto os novos inibidores seletivos da COX-2 podem reduzir a síntese do protetor vascular, a prostaciclina, aumentando o risco de trombose. De fato, experiências com a terapia neutralizadora de TNF-alfa também têm revelado complicações. Estes efeitos adversos se devem à inibição de fatores endógenos essenciais à fisiologia normal, ou, no caso dos anti-TNF-alfa, por suprimir a capacidade do hospedeiro se defender adequadamente contra infecções, dado que a resposta inflamatória inata é um evento benéfico de defesa (GILROY et al., 2004).

Fármacos AINEs são os medicamentos mais comumente usados no alívio dos sintomas, particularmente dor e inflamação. Contudo, também causam sérios efeitos adversos e os mais importantes vão de uma lesão gástrica à ulceração, falência renal e asma (RANG, 2007). Assim, situações patológicas em que a resposta inflamatória torna-se um fator de lesão, perda das funções normais do organismo e até mesmo um fator de risco de morte, possuem inúmeras alternativas terapêuticas. Contudo, tais alternativas mostram-se apenas paliativas, e/ou apresentam efeitos colaterais que, muitas vezes, se sobrepõem às vantagens do tratamento. Desta forma, a busca por novas abordagens terapêuticas, e/ou tratamentos antiinflamatórios com menos efeitos adversos utilizando plantas de uso popular se faz necessário (SILVA, 2006).

3.4 Plantas medicinais e fármacos derivados de plantas

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Os primeiros registros do uso de plantas medicinais datam de cerca de 3.000 anos a.C. O Papiro de Erbes, decifrado em 1873 por Georg Erbes, representa o primeiro tratado médico conhecido que descreve a prática da fitoterapia (TESKE e TRENTINI, 1997).

As plantas medicinais sintetizam, através de seu metabolismo primário, diversos nutrientes e, através do metabolismo secundário, substâncias com ação farmacológica denominadas de princípios ativos. Por isso, elas devem ser consideradas não apenas como matéria-prima para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado. Desta forma, fitoterapia é a forma de tratamento e prevenção de doenças que utiliza plantas. A descoberta de substâncias, que em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química, possuem atividade farmacológica, muitas vezes já confirmada pelo uso popular e comprovada cientificamente, gera interesses institucionais e governamentais (AGRA et al., 2008).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, entre outros, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais. Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância atualmente, podemos mencionar a forscolina, obtida de *Coleus barbatus*, que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores, a artemisinina, presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica, e o diterpeno anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que apresenta propriedades farmacológicas contra o câncer de ovários e pulmões (BALUNAS e KINGHORN, 2005).

Os produtos naturais, com o passar dos anos, contribuíram muito para o desenvolvimento de novos fármacos para fins terapêuticos. Muitos metabólitos secundários derivados de plantas são conhecidos por atuarem direta ou indiretamente em moléculas ou interferem no mecanismo de ação de: mediadores inflamatórios, produção e ação de segundos mensageiros, expressão dos fatores de transcrição e expressão de moléculas pró-inflamatórias (CALIXTO et al., 2003).

Segundo a OMS 65-80% da população dos países em desenvolvimento, e entre estes o Brasil, dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Além disso, no Brasil, o uso de plantas medicinais sempre foi significativo, por fazer parte da cultura popular, principalmente pela extensa e diversificada flora (CALIXTO, 2005).

As ações públicas que fomentam ações sobre produtos naturais aplicados à saúde, ganharam força em 21 de maio de 1993, onde a Portaria número 546 do Ministério da saúde criou o Grupo Consumidor Técnico-Científico da Secretária de Vigilância Sanitária, com o intuito de estabelecer normas, controle de serviços, controle de produção, armazenagem e a utilização de substâncias e produtos naturais. Com isso, a fitoterapia foi reconhecida como prática do sistema de saúde no Brasil. Porém, apenas em 2006, o Ministério da saúde por meio da

portaria Nº 971 da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) normatizou no Sistema Único de saúde (SUS) o uso de plantas medicinais e fitoterapia dentre outras práticas terapêuticas. Neste mesmo ano, o decreto Nº 813, de 22 de junho aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, estabelecendo diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas a garantir o acesso seguro, o uso racional de plantas medicinais e fitoterápico pela população, bem como a utilização sustentável da biodiversidade em nosso país (MS, 2009).

Dentro deste contexto, o Brasil é um país privilegiado, pois ocupa o primeiro lugar dentre os 17 países mais ricos do mundo em biodiversidade, possuindo cerca de 20 % do total de espécies existentes no planeta (BANDEIRA-MELO et al., 2000; CALIXTO et al., 2001). A imensa variedade de espécies vegetais apresenta um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos e dentro desta expectativa encontram-se as plantas da família Clusiaceae conhecidas popularmente pela variedade de aplicações e importância econômica, industrial e paisagismo.

3.5 Família Clusiaceae, o gênero *Clusia* e a espécie *Clusia nemorosa* Mey

De acordo com a classificação filogenética, Clusiaceae pertence à ordem Malpighiales. O nome tradicional para a família, Guttiferae, significa “portando goma”, em consequência à secreção de coloração variada, característica do grupo (JUDD et al., 1999). Nesta família ocorrem aproximadamente 40 gêneros, a maioria deles em regiões tropicais. As cerca de 1200 espécies são predominantemente lenhosas e possuidoras de látex na maioria de seus tecidos (OLIVEIRA et al., 1996). As espécies desta família possuem hábitos bastante variados, podendo ser arbóreas, epífitas ou hemiepífitas. Clusiaceae engloba diversas plantas de valor econômico, incluindo gêneros conhecidos por apresentar madeira de grande valor, gêneros com propriedades medicinais e outros com interesse ornamental (ANDRADE et al., 1987). No Brasil, a família possui aproximadamente 19 gêneros, sendo que os mais representativos são: *Clusia*, *Kielmeyera*, *Tovomita* e *Vismia*, com ampla distribuição nos vários Estados (ANDRADE et al., 2002).

Vários membros da família Clusiaceae exibem uma ampla variedade de atividades biológicas, sendo que já foram isolados de 20 espécies diferentes mais de 100 componentes com propriedades antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiviral e antidepressiva. Estudos demonstram que as plantas desta família são ricas em flavonóides, benzofenonas, xantonas, terpenos e esteróides, substâncias químicas bioativas que devem ser as responsáveis pelas atividades antiinflamatória e analgésica, citotóxica e antimicrobiana demonstradas pelos extratos de plantas brasileiras como *Rheedia longifolia*, *Tovomita brevistaminea* e *Vismia guianensis*, respectivamente (FRUTUOSO et al., 2007; SUFFREDINI et al., 2006).

O gênero *Clusia*, pertence à subfamília Clusioideae, é caracterizado por aproximadamente 300 espécies, distribuídas geograficamente desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil (JUDD et al., 1999). No Brasil, sua distribuição é mais freqüente na região Amazônica, sendo todas as plantas verdes e a maioria lenhosa (ANDRADE et al., 2002). O nome *Clusia* foi proposto primeiramente por Plumier em 1703, para homenagear o botânico belga Jules Charles de l'Ecluse, um dos pioneiros dos estudos florísticos. Entretanto, o gênero só foi efetivamente descrito por Linneu em 1753, na primeira edição do "Species Plantarum", tendo *Clusia major* L. como espécie-tipo (PLANCHON e TRIANA, 1860). A primeira referência a uma espécie deste gênero para o Brasil foi feita por Macgrave em 1648, cujo material foi coletado na região de Pernambuco e posteriormente identificado como *Clusia nemorosa* (ANDRADE-LIMA et al., 1977). Desde então, várias outras espécies foram identificadas e estudadas quimicamente, sendo que destas investigações foram isoladas várias substâncias químicas, principalmente triterpenóides, flavonóides e benzofenonas, que podem estar relacionados com os diferentes efeitos farmacológicos apresentados pelos extratos de *Clusia* sp (SUFFREDINI et al., 2006; NEVES et al., 2007).

Clusia nemorosa é uma árvore que possui folhas oblongas e cartáceas, flores com pétalas brancas e, ao redor dos verticilos férteis é rosado, os estames são marrons, a secreção é produzida por estaminódios nas flores e ambos os sexos (MESQUITA e FRANCISCON, 1995) (Ilustrações 3 e 4). Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, esta espécie é conhecida por "orelha-de-burro" ou "pororoca", respectivamente. Esta espécie vem sendo amplamente utilizada na medicina

popular para o tratamento de diferentes enfermidades, incluído dores de cabeça e inflamação (LOPES e MACHADO, 1998). Estudos fitoquímicos feitos em *C. nemorosa* têm demonstrado a presença de dois derivados das quinonas, o Nemorosonol, um derivado do triciclo decano-7-hidroxi-2,9-diona, e o Nemorosonol B, uma quinona alquil-aril poliisoprenilada, além de uma nova cromona alquil, kaempferol e β -sitosterol glicosídeo. Além destas substâncias, grupos de compostos bioativos como os sesquiterpenos também já foram encontrados em extratos de *C. nemorosa* (DELLE MONACHE et al., 1988, 1991; DELLE MONACHE, 1990; ANDRADE, ALMEIDA e CONSERVA, 1998). No entanto, até o momento não há registro de nenhum estudo científico que comprovasse seus efeitos antiinflamatórios.



Ilustração 3: flor e folhas de *C. nemorosa*.

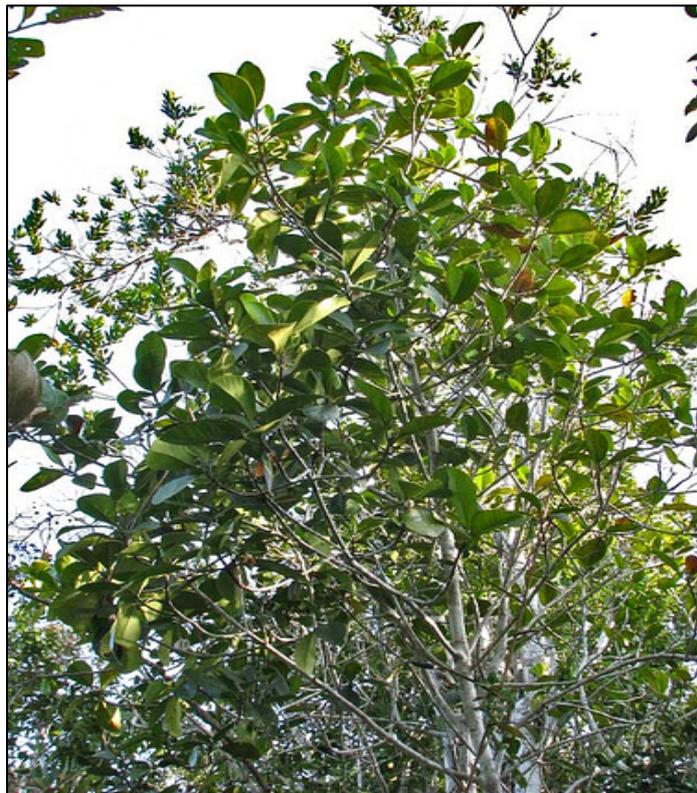


Ilustração 4: Árvore de *C. nemorosa*

4 MATERIAL E MÉTODOS

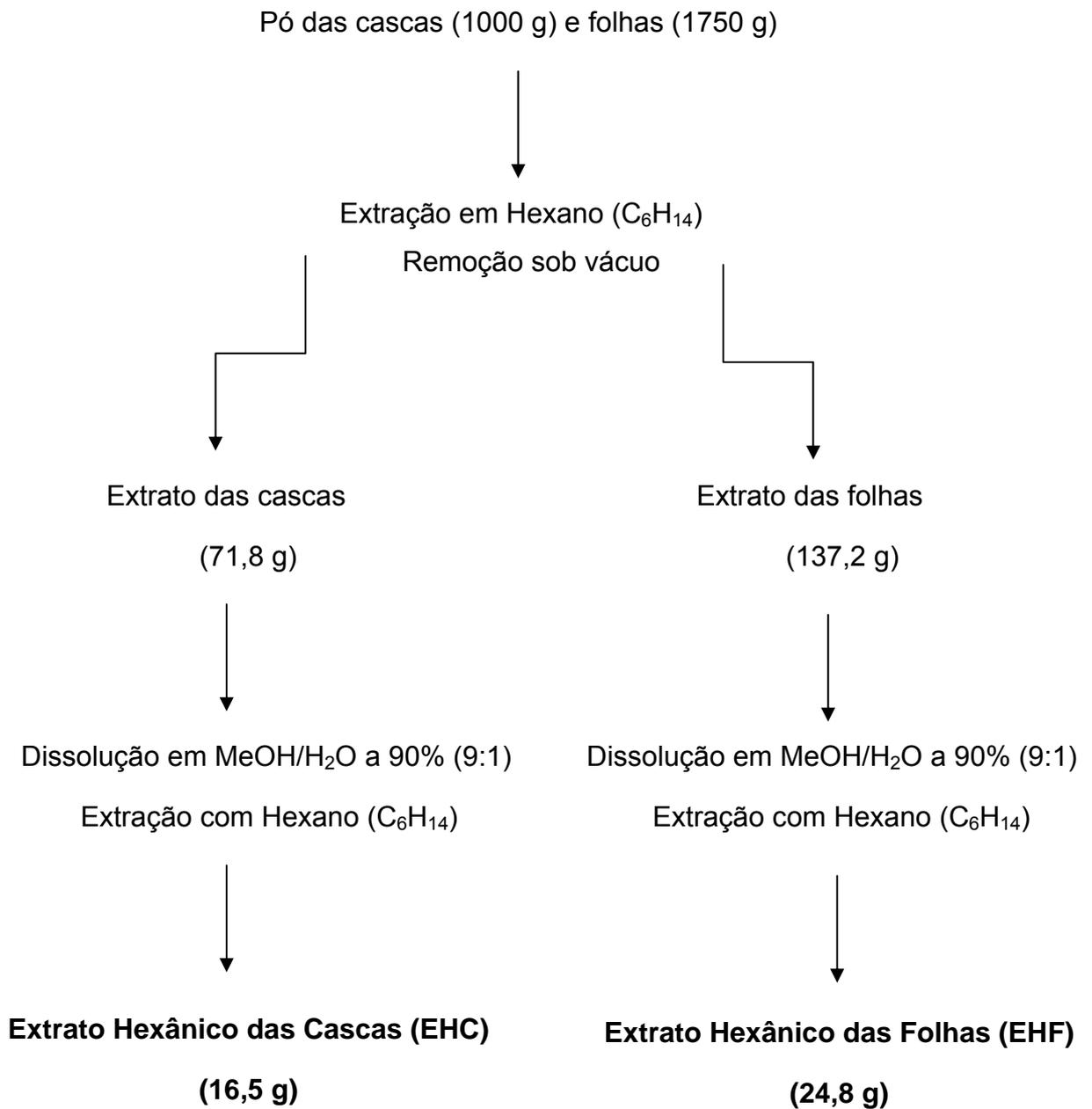
4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss adultos de ambos os sexos (18 a 25 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por um período de pelo menos 1 hora (h) antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram aprovados e estão de acordo com as normas do Comitê de Ética Institucional da UFAL (Protocolo nº 23065.12614/2006-89).

4.2 Material da planta e preparação dos extratos

A planta *Clusia nemorosa* Mey foi coletada na zona da mata do município de Murici, estado de Alagoas, e encaminhada para o Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB/UFAL). A espécie foi coletada e taxonomicamente identificada pela botânica Rosângela P. de Lyra Lemos do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA-AL), sendo depositada no herbário sob registro MAC-8734.

Após a coleta, as cascas e as folhas foram secas espontaneamente a sombra, sendo em seguida moídas para obtenção do pó. A partir das cascas (1000 g) e folhas (1750 g) foram feitas sucessivas extrações em hexano a temperatura ambiente com duração de duas semanas. Após a remoção do solvente sob vácuo, os extratos obtidos [cascas (71,8 g); folhas (137,2 g)] deste processo foram dissolvidos em MeOH-H₂O (90%) e extraídos com hexano. Dessa forma, obteve-se o extrato hexânico das cascas (16,5 g), denominado EHC, e o extrato hexânico das folhas (24,8 g), denominado EHF, utilizados neste trabalho (Fluxograma).

Fluxograma: Preparação dos extratos de *Clusia nemorosa* em Hexano

4.3 Pleurisia induzida por carragenina

A pleurisia foi induzida pela injeção intratorácica (i.t.) de 0,1 mL de uma suspensão de carragenina 1 % diluída em salina estéril. Animais controles receberam o mesmo volume do veículo. Quatro horas após estímulo os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram a cavidade pleural aberta, lavada com 1 mL de solução de PBS (1X) contendo EDTA (10 mM) e o volume recuperado com o auxílio de pipeta automática para posterior análise de proteínas por ELISA ou células em câmara de Neubauer e citocentrifugado. Os animais foram pré-tratados com os extratos (1, 10 e 100 mg/kg, i.p.) ou salina uma hora antes da injeção do agente inflamatório.

4.4 Quantificação de TNF-alfa

A quantidade do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) produzida na cavidade pleural foi avaliada 4 h após injeção com salina ou estímulo. O lavado pleural recuperado foi centrifugado a 770 x g por 10 min e do sobrenadante livre de células foi quantificado o conteúdo de TNF-alfa pelo ensaio imunoenzimático (ELISA; Nunc Maxsorp) como descrito por Bandeira-Melo et al. (2000). As placas foram cobertas com 50 µL com anticorpo monoclonal anti-TNF-alfa (4 µg/mL) por 24 h. Após duas lavagens com PBS/tween os sítios de ligação não-específicos foram bloqueados com 200 µL de PBS-Milk (3%) por 1 h a 20°C, seguido por quatro lavagens com PBS/tween. Os lavados pleurais foram adicionados aos poços e mantidos refrigerados (4°C) por 24 h. Em seguida, após quatro lavagens com PBS/tween, foi adicionado 100 µL do anticorpo monoclonal purificado anti-TNF-alfa biotilado (2 µg/mL) diluído em PBS-Milk (3%) por 1 h. Após este período, a placa foi lavada e novamente incubada com 50 µL da enzima conjugada com avidina por 30 min. A seguir, após duas lavagens com PBS/tween, foi adicionado em cada poço 100 µL de solução tampão de perborato e OPD (substrato) por 25 min antes do bloqueio da reação com uma solução de H₂SO₄ (2M). A curva padrão foi preparada com concentrações decrescentes da proteína recombinante diluída em PBS-Milk (3%). A quantificação foi realizada utilizando um leitor de microplaca na absorvância de 490 nm.

4.5 Obtenção de neutrófilos humanos

Os neutrófilos humanos foram isolados do sangue periférico de um voluntário saudável como descrito previamente. O sangue (20 mL) foi recolhido em tubo contendo citrato (3,8 %) e centrifugado a 300 x g por 20 min para obtenção de plasma rico em plaquetas, sob o qual foi colocado 3 mL de Percoll (90 %). Após centrifugação (2000 x g, 20 min), o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi recolhido e posto em repouso para precipitação de células. O precipitado celular foi acrescido de 3 mL de dextran (6 %) por 30 min para lise das hemácias. A fração rica em leucócitos foi novamente centrifugada (200 x g, 8 min), sendo o gradiente formado pelo pellet da centrifugação, por 2 mL de PPP, 3 mL de Percoll a 42 % e 3 mL de Percoll a 51%. Em seguida, o gradiente foi submetido à centrifugação (260 x g, 11 min e 30 seg) para formação do halo de polimorfonucleares, ao qual foi acrescida de Hanks livre de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} .

4.6 Quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*

A capacidade de migração de neutrófilos foi avaliada em microcâmara de quimiotaxia de 48 poços (Neuro Probe, Cabin John, MD, USA), separadas por um filtro de nitrocelulose com poros de 3 μm de diâmetro. Esta câmara é composta por dois compartimentos: 1) um inferior onde foram colocados meio de cultura RPMI-BSA (0,01 %) ou estímulo quimiotático (CXCL1, 10 μM) diluído em RPMI-BSA. 2) e outro superior no qual foi colocado 50 μL de uma suspensão de neutrófilos (2×10^5 células/mL) purificados de doadores saudáveis. No processo de montagem da câmara, sobre o compartimento inferior foi colocado um filtro de nitrocelulose com poro de 3 μm (Toyo), previamente umedecido em RPMI-1640, e sobre este uma membrana de silicone. Uma vez montada a parte inferior da câmara será depositada sobre esta o compartimento superior. Este compartimento é então fortemente fixado ao sistema acima descrito, por intermédio de parafusos. Sobre a câmara montada é colocada uma lâmina, visando impedir evaporação do material. A câmara foi assim posteriormente incubada, a 37°C por 1 h, em estufa contendo atmosfera de 95% O_2 e 5% CO_2 . Após esse tempo o filtro foi removido, fixado e corado (May-Grunwald-Giemsa). Para avaliar a emigração de neutrófilos, as células foram contadas em 15 campos consecutivos a uma distância fixa de 40 μm da superfície do filtro sob microscopia óptica na objetiva de 100 x. Os resultados foram expressos como

número de neutrófilos emigrados por campo. Para avaliar a interferência dos extratos (5, 50 e 500 µg/mL) ou dexametasona (Dexa, 50 nM) na migração de neutrófilos, as células foram pré-incubadas por 1 h a 37°C antes do estímulo quimiotático. Como controle foi utilizado RPMI-BSA no compartimento inferior da câmara.

4.7 Avaliação de apoptose por citometria de fluxo

Neutrófilos humanos purificados (5×10^5 células/ml) foram incubados com os extratos das cascas e das folhas (50 e 500 µg/mL) por 1 h a 37°C em placa de 96 poços (Corning, NY, USA) num volume final de 100 µL. O grupo de células controle foi incubado com RPMI-BSA (0,01 %) nas mesmas condições descritas. Posteriormente, foi adicionado em cada poço 100 µL de PBS ázida (0,1 %), sendo a placa centrifugada a 1.800 rpm por 5 min. Ao final deste processo, ao “pellet” foi adicionado 25 µL de anexina V-FITC (BD Pharmingen) e 7-amino-actinomicina (7-AAD) (25 µg/mL, Sigma) por 20 min a 4°C ao abrigo da luz. A seguir, 300 µL desta suspensão celular foi transferida para um tubo apropriado e as células foram analisadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia). Para a análise, 10^5 eventos foram adquiridos, e gráficos baseados na emissão de fluorescência do FITC (FL-2) e do 7-AAD (FL-3) foram construídos em escala logarítmica. Como controle positivo (morte celular) foi feita a incubação por 1 h de neutrófilos humanos em temperatura de 40-42°C. Foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima da linha limite de fluorescência, a qual foi negativa para o controle. Os resultados foram analisados com auxílio do software Cell Quest (Becton & Dickinson, San Jose, CA).

4.8 Pleurisia alérgica induzida por antígeno

Para este modelo os animais foram sensibilizados através da injeção subcutânea (s.c.) dorsal de uma mistura contendo ovoalbumina (OVA, 50 µg) e hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$, 5 mg) em volume final de 0,2 mL. Após 14 dias do processo de sensibilização os animais foram desafiados através da injeção intratorácica de OVA na concentração de 12 µg/cavidade, dissolvida em salina estéril em volume final de 0,1 mL. Foram usados como controles negativos os animais sensibilizados desafiados com salina. Em outro grupo desafiado, os animais

foram tratados com os extratos (100 mg/kg, i.p.) no tempo de 1 hora antes do desafio. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ em diferentes tempos após o estímulo. A cavidade pleural foi lavada com 1 mL de PBS (1X) contendo EDTA (10 mM) e o lavado foi recuperado com o auxílio de pipeta automática para posterior análise de células em câmara de Neubauer e citocentrifugado.

4.9 Avaliações dos leucócitos

O número total de leucócito recolhido no lavado pleural foi avaliado através da contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. As amostras foram diluídas (40X) em líquido de Türk. A contagem diferencial dos leucócitos foi feita em citocentrifugado corados pelo método de Panótico rápido. As contagens da análise diferencial foram realizadas em microscópio óptico com a objetiva de imersão onde se contou 100 células por lâmina.

4.10 Quantificação do RNA mensageiro de proteínas inflamatórias

Com o objetivo de verificar o efeito dos extratos sobre a indução de proteínas envolvidas na modulação da inflamação alérgica, foram avaliados os níveis do RNA mensageiro (RNAm) para duas proteínas: IL-5 e CCL11 (eotaxina). Para tanto, leucócitos foram recolhidos do lavado pleural após 6 h do desafio com antígeno (OVA), em condições livres de RNase. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e o RNA total extraído utilizando reagente Trizol. A transcrição reversa (RT) foi realizada com 2 µg de RNA total, utilizando OLIGO dT como *primer* (0,05 mM), RT (50 UI), dNTP (144 µM), tampão de reação (DTT 10mM, MgCl₂ 3 mM, KCl 75 mM e Tris-HCl 50 mM em pH 8,3) e 2 U de RNAsin Plus, em volume final de 12,5 µl. Para obtenção do DNA complementar (cDNA) as amostras foram aquecidas por 5 min a 70 °C, resfriadas a 4°C por 5 min e mantidas a 25°C durante a adição da enzima RT. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 60 min, 70°C por 5 min e resfriadas a 4°C por 5 min. Para esta reação, alíquotas de 2 µl do RT foram adicionadas e um tampão contendo: TRIS-HCL 10 mM (pH 9), MgCl₂ 1 mM, dNTP 200 µM, 300 nM de cada *primer* e 5 U de *Taq* polimerase, em um volume final de 30 µl. Alíquotas de 5 µl de cada amostra foram analisadas em gel Tris/borato/EDTA (TBE)-poliacrilamida 6 % e coradas com nitrato de prata. As análises quantitativas foram realizadas em relação à banda da β-actina.

A seqüência dos *primers* utilizados está demonstrada na tabela a seguir:

Gene	Primer	Seqüência (5' - 3')
IL-5	Fwd	TCA TAA AAA TCA CCA GCT ATG C
	Rev	TTG GAA TAG CAT TTC CAC AGT
Eotaxina	Fwd	GCT CAC CCA GGC TCC ATC
	Rev	TGT TGT TGG TGA TTC TTT TGT AGC
β -actina	Fwd	GCT ATC CAG AAA ACC CCT CA
	Rev	GCG GGT GGA ACT GTG TTA C

4.11 Formação de granuloma por implante de algodão

Em condições assépticas e sob anestesia com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p) efetuou-se incisão longitudinal dorsal (1 cm) em cada animal e implantou-se, mediante divulsão do tecido subcutâneo, um disco de algodão branco pesando 10 mg. Os discos de algodão foram previamente esterilizados por autoclavagem em lotes de dez unidades, e, imediatamente antes do implante, foram tratados com 0,4 mL de solução aquosa de penicilina a 5 %. O tratamento com os extratos (100 mg/kg, i.p.), salina ou dexametasona (1 mg/kg, i.p.) foi iniciado no dia seguinte e mantido durante sete dias consecutivos. No 8º dia, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e o tecido granulomatoso removido e seco a 37°C por 6 horas para posterior pesagem. Em seguida, foi determinado a massa bruta em balança analítica, sendo a massa do granuloma calculada pela diferença entre a massa seca inicial (10 mg) e a massa final.

4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através do teste de análise de variância do teste t (ANOVA), seguido do teste estatístico one-way de Newman-Keuls-Student. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM.) de no mínimo 5 animais, onde os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do extrato hexânico da cascas e das folhas de *C. nemorosa* sobre a pleurisia induzida por carragenina em camundongos

Com propósito de avaliar o efeito do extrato hexânico obtido da casca e da folha de *C. nemorosa* sobre o processo inflamatório, inicialmente foi utilizado o modelo de pleurisia induzida por carragenina. Neste modelo, observamos que a injeção intratorácica de carragenina foi capaz de induzir um aumento no número de leucócitos totais na cavidade pleural no tempo de 4 h quando comparado ao grupo controle estimulado com salina (Figura 1 A). Quando os animais foram pré-tratados com o extrato hexânico da casca (1, 10 e 100 mg/kg, i.p.) observamos que apenas as maiores doses impediram de maneira significativa o recrutamento leucocitário (Figura 1 A). De modo semelhante, o pré-tratamento com extrato hexânico das folhas (1, 10 e 100 mg/kg, i.p.) também suprimiu o influxo de leucócitos totais para a cavidade pleural após o estímulo apenas nas duas maiores doses (Figura 1 A). O grupo tratado com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) apresentou uma redução significativa de 64,8% no número de leucócitos totais estimulados.

Avaliando o tipo celular mobilizado para cavidade torácica após estímulo com carragenina, observamos a presença de um intenso infiltrado de neutrófilos no tempo de 4 h quando comprado ao grupo estimulado com salina (Figura 1 B). Entretanto, o pré-tratamento com o EHC (1, 10 e 100 mg/kg, i.p.) foi capaz de promover uma inibição significativa no acúmulo pleural de neutrófilos nas doses de 10 e 100 mg/kg após estímulo inflamatório (Figura 1 B), sendo que a dose de 100 mg/kg deste extrato foi capaz de induzir uma inibição de 41,2 %. Um perfil de inibição semelhante pode ser observado quando os animais foram tratados com EHF, somente nas doses de 10 e 100 mg/kg também notou-se uma redução no influxo de neutrófilos, sendo que a maior dose apresentou um percentual de inibição de 45,3 % em comparação ao grupo controle (Figura 1 B). O pré-tratamento com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) promoveu um percentual de inibição de 69,6% no acúmulo pleural de neutrófilos após estímulo inflamatório.

Ainda neste modelo, notamos que o estímulo com carragenina induziu para a cavidade torácica um aumento significativo no número de células mononucleares quando comparado ao grupo controle estimulado com salina (de $1,18 \pm 0,14$ para $2,08 \pm 0,15 \times 10^6$ células/cavidade). Entretanto, o tratamento prévio (i.p.) dos animais com EHC nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg não foi capaz de alterar de maneira significativa com o número células mononucleares recrutadas pelo estímulo com carragenina, $2,26 \pm 0,15 \times 10^6$ células/cavidade, $2,55 \pm 0,13 \times 10^6$ células/cavidade, $2,93 \pm 0,18 \times 10^6$ células/cavidade, respectivamente. De modo semelhante o pré-tratamento com o EHF nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg (i.p.) também não foi capaz de modificar o perfil de células mononucleares após estímulo, $2,36 \pm 0,20 \times 10^6$ células/cavidade, $2,62 \pm 0,17 \times 10^6$ células/cavidade, $3,02 \pm 0,15 \times 10^6$ células/cavidade, respectivamente. O grupo tratado com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) apresentou uma média de $1,58 \pm 0,15 \times 10^6$ células/cavidade após estímulo.

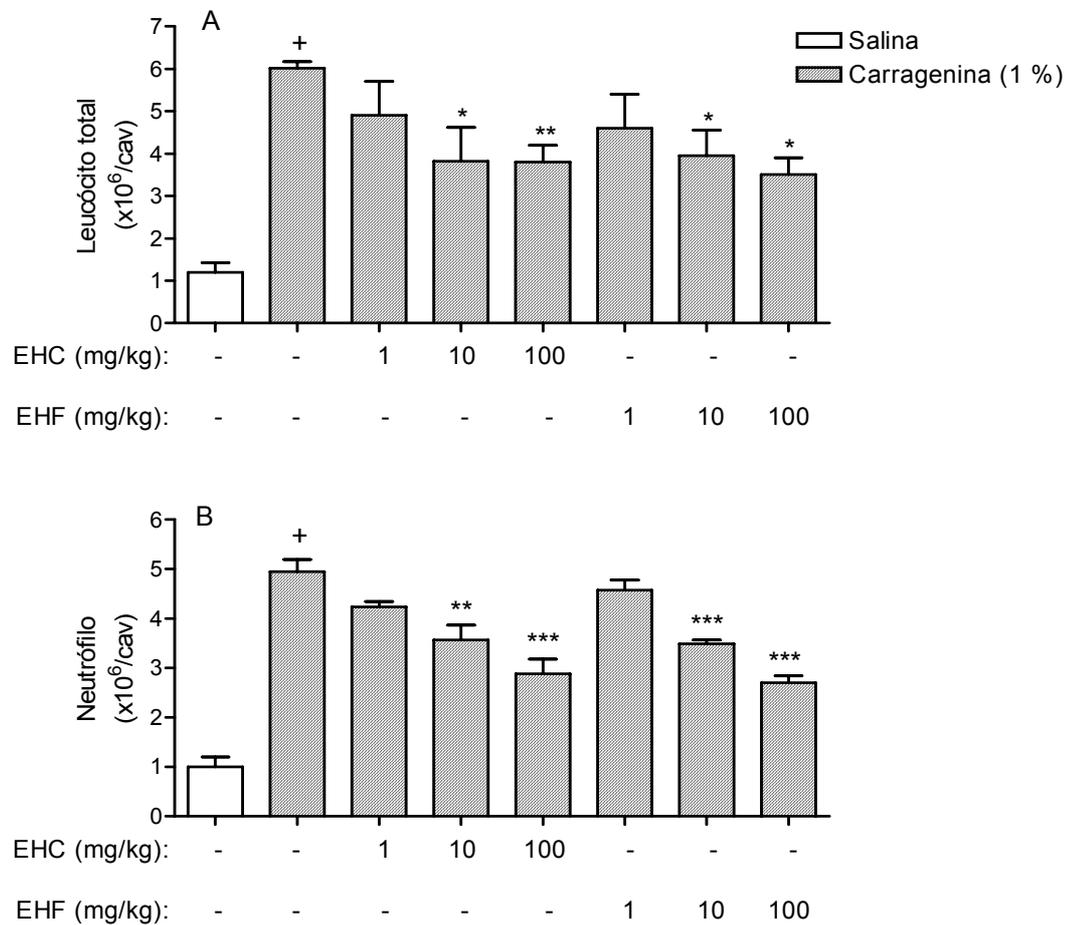


Figura 1. Efeito do EHC e HEF sobre a pleurisia induzida por carragenina. Os animais foram injetados com salina ou carragenina (1%, i.t.) e sacrificados após 4 h. O gráfico A representa o total de leucócitos e B o acúmulo de neutrófilos que migraram para a cavidade pleural após injeção com carragenina. Os resultados foram representados pela média \pm E.P.M. de 5 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ⁺P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo salina. *P<0,01, **P<0,05, ***P<0,001 denotam níveis de significância comparado ao grupo carragenina.

Com o propósito de avaliar o efeito do tratamento com os extratos de *C. nemorosa* sobre a produção de TNF-alfa induzida por carragenina no modelo de pleurisia, quantificamos por ELISA o conteúdo total desta citocina no lavado pleural 4 h após estímulo. Assim, notamos que o grupo estimulado com carragenina apresentou um aumento na produção de TNF-alfa no espaço pleural quando comparado ao grupo controle estimulado com salina (Tabela 1). Verificamos também que tanto o pré-tratamento com o EHC quanto o EHF (ambos 100 mg/kg, i.p.) inibiram de forma significativa a produção de TNF-alfa no fluido pleural após estímulo com carragenina. Em outro grupo experimental, quando os animais foram submetidos ao tratamento prévio com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) 1 h antes do estímulo com carragenina também apresentaram uma inibição no conteúdo de TNF-alfa do lavado pleural (Tabela 1). Utilizamos apenas a dose de 100 mg/kg neste ensaio, pois foi a que apresentou uma melhor potência do efeito antiinflamatório verificado no modelo de pleurisia por carragenina.

Tabela 1. Efeito do tratamento com o EHC e o EHF sobre a produção de TNF-alfa em animais estimulados por carragenina.

Tratamento	Carragenina (1 %)	TNF-alfa (ng/cavidade)	Inibição (%)
Salina	-	0,14 ± 0,02	-
-	+	3,4 ± 0,09 ⁺	-
EHC (100 mg/kg)	+	2,7 ± 0,05 *	20,6
EHF (100 mg/kg)	+	2,4 ± 0,05 *	29,4
Dexa (1 mg/kg)	+	1,1 ± 0,06 ***	67,6

Dexametasona (Dexa, i.p.) foi utilizado como fármaco de referência. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ⁺P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo salina. *P<0,01, ***P<0,001 denotam níveis de significância comparado ao grupo estimulado com carragenina.

5.2 Efeito do extrato hexânico das cascas e das folhas de *C. nemorosa* sobre a ativação de neutrófilos humanos *in vitro*

Para avaliar um possível efeito direto dos extratos de *C. nemorosa* sobre os neutrófilos, utilizamos o sistema quimiotaxia de neutrófilos utilizando câmara de Boyden. Neste sistema, os neutrófilos humanos foram pré-incubados com o EHC e o EHF em diferentes concentrações por 1 h. Em seguida, as células foram provocadas a migrar utilizando CXCL1 (10 μM) como estímulo. Assim, verificamos que os neutrófilos demonstraram um aumento na migração após estímulo por CXCL1 em comparação ao grupo de células estimuladas com PBS (migração basal) (Figura 2). A pré-incubação das células com o EHC (5, 50 ou 500 $\mu\text{g/mL}$) não foi capaz de alterar o potencial migratório dos neutrófilos após estímulo (Figura 2). Entretanto, a incubação com o EHF (5, 50, 500 $\mu\text{g/mL}$) reduziu significativamente a migração neutrofilica nas duas maiores concentrações testadas. De maneira semelhante, a dexametasona (50 nM) também inibiu significativamente a quimiotaxia de neutrófilos após estímulo *in vitro*.

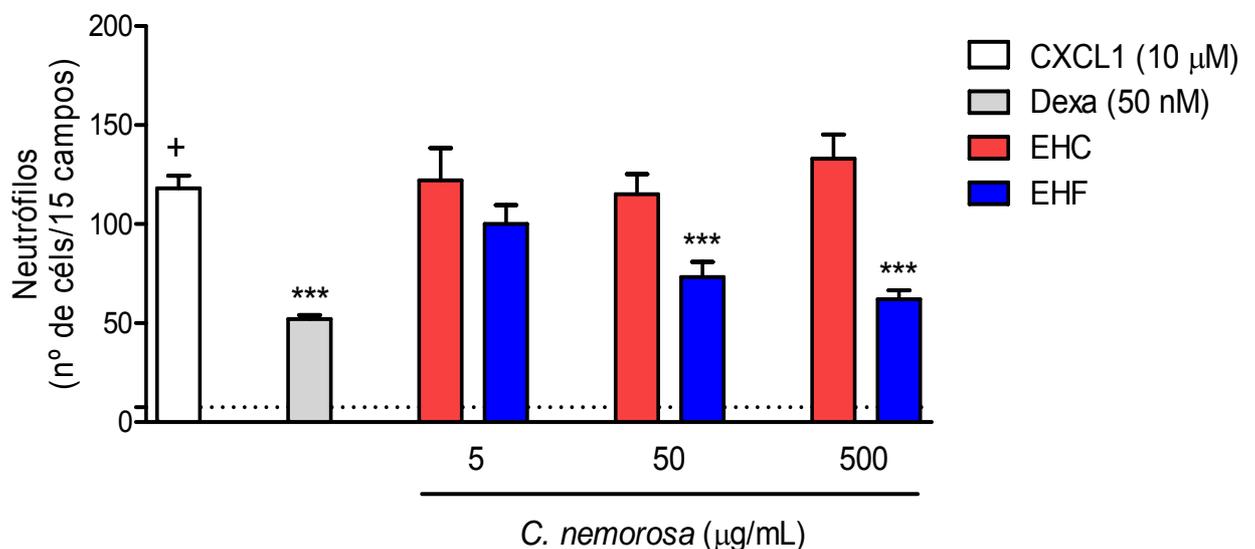


Figura 2. Efeito do EHC e EHF sobre a quimiotaxia de neutrófilos humanos *in vitro* após estímulo por CXCL1. Neutrófilos purificados foram estimulados com RPMI-BSA ou CXCL1 (10 μM) por 1 h. A linha pontilhada representa a migração de neutrófilos quando utilizado apenas RPMI-BSA no compartimento inferior da câmara. $^+P < 0,001$ denota nível de significância comparado ao grupo estimulado apenas com RPMI-BSA. $^{***}P < 0,001$ denotam níveis de significância comparado ao grupo estimulado com CXCL1.

Com propósito de avaliar uma possível interferência destes extratos na viabilidade destes neutrófilos, realizamos uma análise no citômetro de fluxo com anexina V-FITC e 7-amino-actinomicina (7-AAD). Neste ensaio, as células foram tratadas com as maiores concentrações que apresentaram efeito inibitório sobre a quimiotaxia em câmara de Boyden. Assim, neutrófilos humanos purificados incubados por 1 hora com EHC e o EHF, ambos nas concentrações de 50 ou 500 µg/mL, foram marcados com anexina V-FITC e 7-AAD e tiveram as fluorescências analisadas. A Figura 3 exibe uma ilustração representativa de como se obteve os dados para análise de apoptose e necrose dos neutrófilos após incubação com os extratos por 1 hora. No eixo x, as células são identificadas para a leitura de anexina V, marcando a apoptose inicial e no eixo y para marcação com 7-AAD, identificador de apoptose tardia ou necrose. O grupo incubado por 1 h em temperatura de 40-42°C apresentou uma redução para 24,08 % de células viáveis, valor significativo em comparação ao grupo incubado com o meio. Assim, podemos observar que tanto o EHC quanto o EHF não foram capazes de induzir apoptose nos neutrófilos humanos após pré-tratamento *in vitro* quando comparado ao controle positivo.

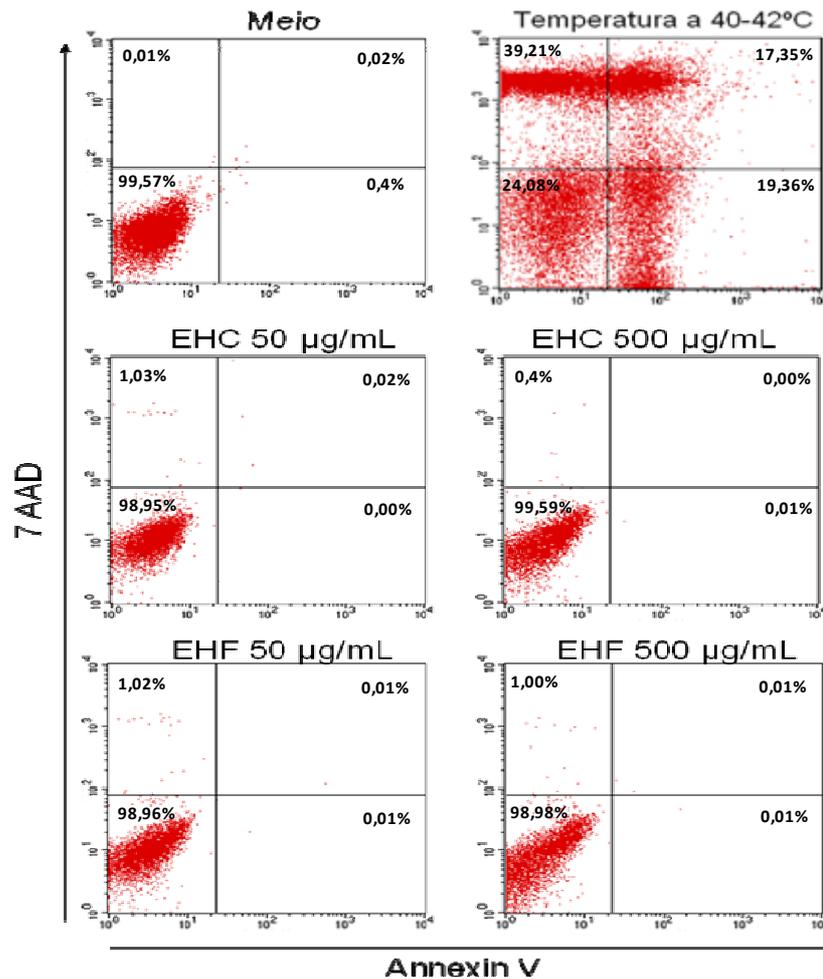


Figura 3. Efeito do EHC e EHF sobre a viabilidade de neutrófilos humanos. As células foram incubadas por 1 h com os extratos, ambos na concentração de 50 ou 500 µg/mL, e em seguida a viabilidade foi avaliada por citometria de fluxo. Os dados são representativos de 3 experimentos.

5.3 Efeito do extrato hexânico das cascas e das folhas de *C. nemorosa* sobre a pleurisia induzida por ovalbumina em camundongos ativamente sensibilizados

Dando continuidade aos estudos sobre a atividade antiinflamatória dos extratos hexânicos de *C. nemorosa*, nesta etapa do trabalho avaliamos os efeitos do EHC e EHF no modelo de pleurisia alérgica, com enfoque sobre o recrutamento de eosinófilos que ocorre 24 h após o estímulo antigênico (SILVA et al., 2001). Como revelado na Figura 4, o desafio antigênico (OVA, 12 µg/cavidade) realizado 14 dias após o processo de sensibilização ativa, foi capaz de induzir um significativo aumento no número de eosinófilos presente na cavidade torácica quando comparado com o grupo estimulado com salina. O pré-tratamento realizado 1 h antes do estímulo alérgico com o EHC (100 mg/kg, i.p.) foi capaz de suprimir de maneira significativa o recrutamento de eosinófilos para o espaço pleural (Figura 4). Entretanto, neste mesmo modelo, o pré-tratamento dos animais com EHF (100 mg/kg, i.p.) não interferiu com o influxo de eosinófilos para o espaço pleural após desafio alérgico. Além disso, cabe destacar que o pré-tratamento com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) foi capaz de suprimir o recrutamento de eosinófilos induzido por antígeno (Figura 4).

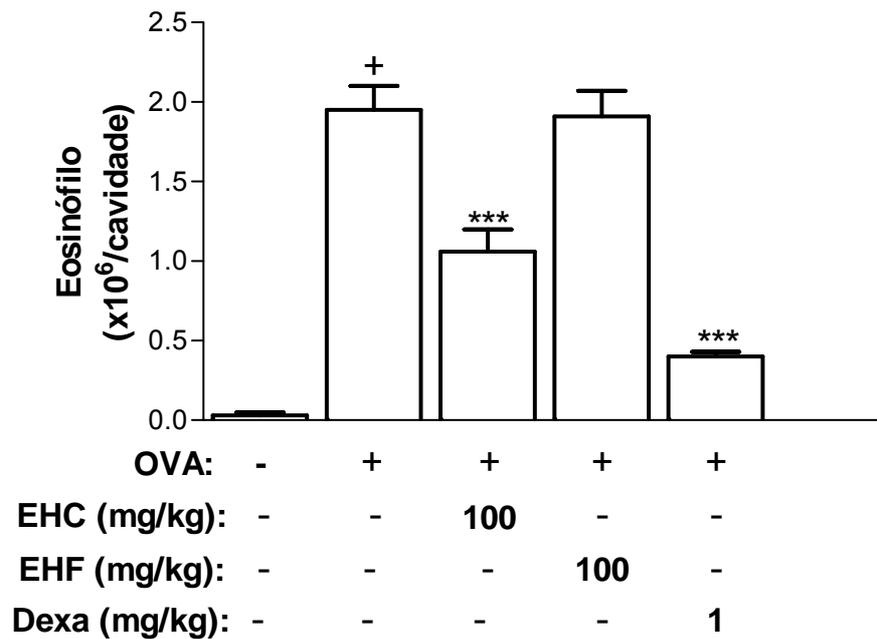


Figura 4. Efeito do EHC ou EHF sobre a eosinofilia induzida por antígeno em animais alérgicos. Os animais sensibilizados foram estimulados com salina ou OVA (12 µg/cav, i.t.) e sacrificados após 24 h. As barras representam a média ± E.P.M. (n = 5). As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ⁺P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo que não foi estimulado com OVA. ^{***}P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo estimulado com OVA.

Visando avaliar um possível mecanismo de ação pelo qual o EHC foi capaz de promover a inibição do recrutamento eosinofílico, animais sensibilizados e desafiados com OVA (12 µg/cav, i.t.) foram sacrificados após 6 h do estímulo antigênico para determinar o conteúdo total de RNA mensageiro (RNAm) das citocinas IL-5 e CCL11 (eotaxina) expresso pelas células presentes no espaço pleural. Neste experimento, observamos que o desafio antigênico induziu um aumento significativo na expressão relativa de RNAm para IL-5 nos leucócitos presentes no espaço pleural quando comparado ao grupo estimulado apenas com salina (Figura 5A). O tratamento com o EHC (100 mg/kg, i.p.) por 1 h antes do estímulo alérgico inibiu de maneira significativa a expressão de RNAm para IL-5 (Figura 5A). De maneira semelhante ao observado com a IL-5, animais alérgicos estimulados antígenicamente exibiram um aumento significativo na expressão relativa de CCL11 quando comparado ao grupo salina (Figura 5B). Neste mesmo experimento, camundongos tratados com EHC também apresentaram uma drástica redução nos níveis de expressão de RNAm para CCL11 quando comparado aos animais apenas estimulados com antígeno (Figura 5B). Dexametasona (Dexa, 1 mg/kg, i.p.) também injetada 1 h antes do estímulo antigênico também foi capaz de suprimir tanto a expressão de RNAm para IL-5 quanto para CCL11 (Figura 5A e 5B).

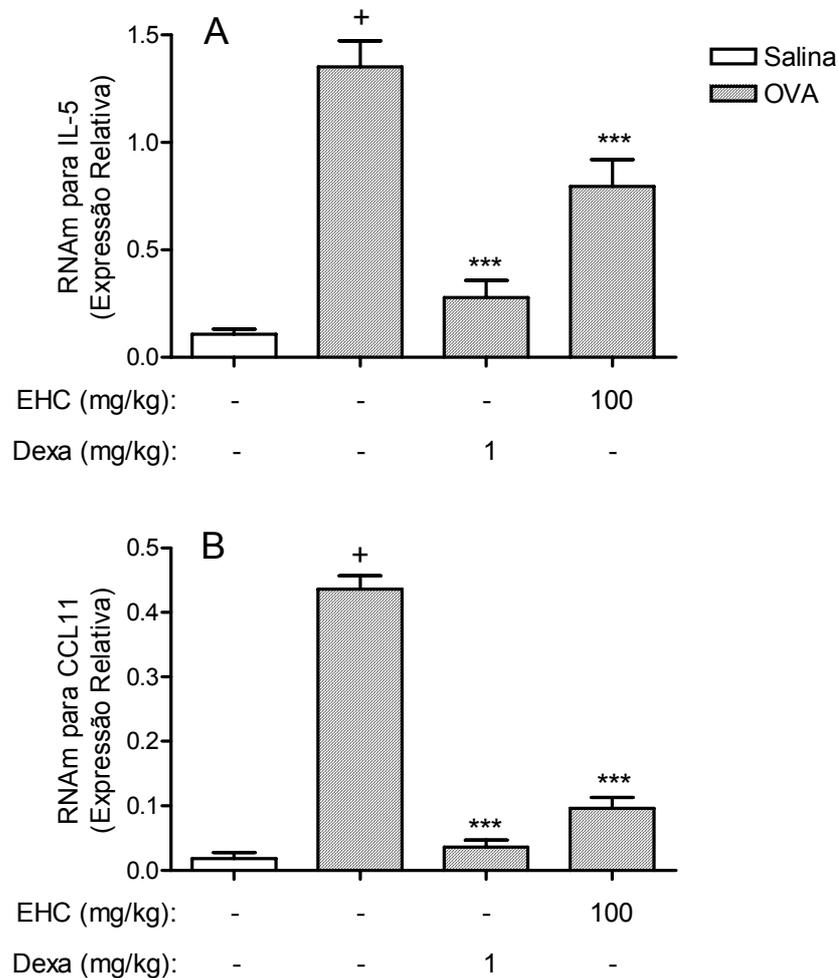


Figura 5. Efeito do EHC sobre a expressão de RNAm nas células recolhidas do lavado pleural. Animais sensibilizados foram injetados com salina ou OVA (12 μ g/cav, i.t.) e sacrificados após 6 h. O gráfico 5 representa o RNAm isolado das células para avaliar a expressão gênica de IL-5 e CCL11 após desafio antigênico. Os resultados foram representados pela média \pm E.P.M. de 5 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ⁺P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo salina. ^{***}P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo estimulado com OVA.

5.4 Efeito do extrato hexânico das cascas e das folhas de *C. nemorosa* no modelo de inflamação crônica induzido por implante de algodão em camundongos

O implante subcutâneo de algodão (10 mg) na região dorsal dos animais induziu a formação do tecido granulomatoso observado em todos os animais no final do sétimo dia (Tabela 2) quando comparado ao grupo que recebeu o trauma cirúrgico mais não o implante de algodão (SHAM). O tratamento realizado por 7 dias consecutivos com o EHC (100 mg/kg, i.p.) promoveu uma redução significativa na formação do granuloma, representando uma inibição no peso relativo do granuloma de 38,8 % (Tabela 2). De maneira oposta, quando os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de tratamento com EHF (100 mg/kg, i.p.), não foi observado uma alteração significativa no peso relativo do granuloma em comparação aos animais controles tratados com salina. Neste mesmo modelo, a administração diária de dexametasona (1 mg/kg, i.p.) por 7 dias resultou numa inibição de 44,1 % no peso relativo do tecido granulomatoso formado (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do tratamento com o EHCn sobre a formação do tecido granulomatoso induzido por discos de algodão.

Tratamento	Dose (mg/kg, i.p.)	Granuloma (mg/g)	Inibição (%)
Salina	-	18,8 ± 1,4	-
EHC	100	11,5 ± 0,9 ***	38,8
EHF	100	17,5 ± 0,8	6,9
Dexa	1	10,5 ± 1,0 ***	44,1

As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ***P<0,001 denotam níveis de significância comparado ao grupo salina.

6 DISCUSSÃO

As plantas medicinais têm sido usadas desde os tempos antigos como medicamento para o tratamento de doenças, tendo um papel importante na saúde mundial. A diversidade química presente nestes organismos proporciona às plantas um papel de destaque no ranking das principais fontes para o isolamento de componentes orgânicos bioativos (BASSO et al., 2005). Dessa forma, compostos derivados de plantas possuem valor histórico como fontes de agentes antiinflamatórios. Portanto, a busca por novos fármacos que interfiram efetivamente com os processos inflamatórios mostra-se de grande importância (CALIXTO et al., 2003; 2005).

No entanto, o aumento do emprego dos produtos naturais traz consigo o uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico, o que é fato preocupante e também chama a atenção dos pesquisadores, uma vez que isto está acontecendo com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população, em diferentes países (BALUNAS e KINGHORN, 2005).

Dessa forma, o potencial natural encontrado nos países latino-americanos, principalmente no Brasil, aliado à diversidade de compostos bioativos encontrados, especialmente nas plantas superiores, têm atraído a atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas que apostam na produção de fitoterápicos como um negócio lucrativo, uma vez que a utilização de plantas medicinais atinge um público cada vez maior (CALIXTO, 2005).

O Brasil com sua enorme biodiversidade pode contribuir para a identificação e desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de produtos naturais. Embora muitas plantas já estejam sendo utilizadas com fins terapêuticos, muitas não possuem dados científicos que comprovem a sua eficácia terapêutica, assim como a garantia da qualidade do produto ou de sua produção (CÔRREA, 1984).

Atualmente, de todos os fármacos disponíveis na terapêutica, em torno de 25-30 % são produzidos a partir de produtos naturais (plantas, microorganismos e animais) ou são derivações destes produtos. Evidências recentes de diferentes indústrias farmacêuticas mostram que, para algumas doenças complexas, os produtos naturais representam uma fonte extremamente valiosa para a produção de novas entidades químicas, visto que são compostos por estruturas químicas privilegiadas, selecionadas por milhões de anos de evolução (CALIXTO, 2005).

Entre estas ricas fontes de novas entidades químicas está a família Clusiaceae. Esta família do reino vegetal é composta por inúmeros membros com vasto espectro de atividades biológicas, incluindo o gênero *Clusia* que compreende aproximadamente 300 espécies (JUDD et al., 1999). Dos vários membros desta família tem sido isolada uma variedade de compostos bioativos com propriedades antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiviral e antidepressiva (GUSTAFSON et al., 1992; ROCHA et al., 1994; MINAMI et al., 1996; VIANA et al., 2003; SUFFREDINI et al., 2006). A literatura mostra que as plantas deste gênero são ricas em flavonóides e biflavonóides, benzofenonas, xantonas, triterpenos e esteróides (DELLE MONACHE et al., 1983; 1984).

Neste contexto, a espécie *Clusia nemorosa* apesar de ser utilizada na medicina popular para várias finalidades não há registro científico que comprove sua atividade antiinflamatória. Assim, no presente estudo, avaliamos pela primeira vez, a atividade antiinflamatória dos extratos hexânicos obtidos das cascas e das folhas de *C. nemorosa* em diferentes modelos de inflamação.

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram inicialmente que tanto o EHC quanto o EHF apresentaram efeito antiinflamatório, o qual foi evidenciado pelo modelo de pleurisia por carragenina. Está bem estabelecido que o acúmulo de leucócitos no sítio estimulado se mostra como uma condição fundamental para o estabelecimento do processo inflamatório, sendo que o influxo celular ocorre como o resultado de muitos eventos, incluindo adesão e mobilidade celular (GUPTA, 2003). Assim, a carragenina produz inflamação por estimular a liberação de mediadores, ocasionando o recrutamento celular, em especial neutrófilo (HENRIQUES et al., 1987). Este agente desencadeia uma resposta inflamatória

bifásica, sendo a primeira fase (1-2 h) dependente da liberação de histamina, serotonina e bradicinina, seguida por uma fase tardia (3-4 h) modulada principalmente pela liberação de prostanóides (OLIVEIRA DE MELO, 2006). O modelo de pleurisia por carragenina tem sido extensivamente usado para investigar o mecanismo envolvido na inflamação aguda e também para avaliar a eficácia de fármacos antiinflamatórios (DALMARCO et al., 2008). Neste modelo, ambos os extratos reduziram significativamente a migração de leucócitos bem como o acúmulo de neutrófilos no espaço pleural. Esse efeito sugere que tanto as cascas quanto as folhas de *C. nemorosa* possui componentes com atividade de prevenir o recrutamento de neutrófilos em um processo inflamatório inespecífico, como a carragenina.

A cavidade pleural é revestida com mesotélio e contém macrófagos residentes, mastócitos e linfócitos. Durante a inflamação pleural, tais células residentes são as principais responsáveis pela secreção de mediadores quimioatratores que recrutam direta ou indiretamente neutrófilos (ISSEKUTZ et al., 1995). Está bem estabelecido que TNF-alfa mostra-se como uma citocina chave no desenvolvimento da inflamação pleural, atuando no aumento da produção de quimiocinas pelas células endoteliais (FRODE et al., 2001; CAILHIER et al., 2006). Dessa maneira, no mesmo modelo de pleurisia por carragenina, realizamos a quantificação do conteúdo total de TNF-alfa no fluido pleural e verificamos que ambos os extratos, provenientes da casca ou folha, mostram-se capazes de suprimir a geração deste mediador. Logo, este relato sugere que o EHC e EHF possuem substâncias capazes de agir sobre células responsáveis pela secreção desta citocina com conseqüente inibição da ativação e migração de neutrófilos. Sabe-se que inúmeras estratégias terapêuticas capazes de inibir a produção de TNF-alfa têm sido sucessivamente usadas no tratamento clínico para o controle de doenças inflamatórias crônicas (FELDMANN, 2002). Desta forma, estes achados podem ser interpretados como uma potencial atividade antiinflamatória da *Clusia nemorosa* sendo esta capaz de reduzir a atividade de neutrófilos. Fármacos que possuem esse tipo de ação bastante conhecida são os antiinflamatórios esteroidais, como a dexametasona (utilizada como controle positivo nesse teste). Dentre os muitos mecanismos de ação, a dexametasona reduz a ativação de fatores de transcrição como a Proteína Ativadora-1 (AP-1) e o fator nuclear NF-kB, fatores relacionados

com a ativação de genes de citocinas primárias como TNF-alfa, gatilhos potentes de muitas ações envolvidas na migração leucocitária. Assim é possível postular que os extratos de *C. nemorosa* possam utilizar esta via para atingir seus efeitos antiinflamatórios. Além disso, não se pode descartar também um possível efeito do extrato sobre a viabilidade e/ou capacidade migratória dos neutrófilos.

Em seguida, foi investigado o efeito direto dos extratos sobre a atividade locomotora dos neutrófilos *in vitro*. Quimiocinas são produzidas em resposta ao estímulo inflamatório, causando o recrutamento de leucócitos por meio da interação de receptores de membrana ligados ao mecanismo de transdução de sinais mediado pela proteína G. CXCL1 é um potente fator quimiotático capaz de se ligar a receptores CXCR1 e CXCR2 expressos nos neutrófilos em diferentes processos inflamatórios. Estudos em modelos de inflamação pulmonar demonstram que o nível de CXCL1 está relacionado com o número absoluto e relativo de neutrófilos no sítio inflamatório (GOMPertz et al., 2001; FOLKERTS et al., 2008). No modelo de quimiotaxia *in vitro* utilizando a câmara de Boyden, somente o EHF foi capaz de inibir significativamente a migração de neutrófilos induzidos por CXCL1, sugerindo que apenas as folhas apresentem uma ou mais substâncias capazes de atuarem diretamente sobre os neutrófilos.

Com propósito de avaliar se a redução na capacidade migratória dos neutrófilos estava ocorrendo devido a uma possível indução de morte celular, avaliamos a viabilidade das células após tratamento *in vitro* com os extratos utilizando células marcadas com anexina V e 7-AAD avaliadas pela citometria de fluxo. Sabe-se que a anexina V é um corante que tem a capacidade de se ligar com a fosfatidilserina exposta na superfície externa da membrana plasmática de células apoptóticas, enquanto o 7-AAD é um corante vital que pode penetrar em algumas células mortas (KOLACZKOWSKA et al., 2009). Neutrófilos são conhecidos por apresentar uma limitada sobrevivência no sangue, e com isso, a apoptose de neutrófilos tem sido caracterizada como um importante fator na resolução da inflamação. Neutrófilos apoptóticos são reconhecidos e fagocitados por macrófagos, limitando o dano tecidual que pode ser causado pela permanência destas células no sítio da inflamação (SOUSA et al., 2010). Nossos resultados revelaram que a incubação por

1 h com os EHC e EHF não induziu apoptose nos neutrófilos, demonstrando que os extratos não interferiram com a viabilidade destas células.

Com intuito de avaliar se o efeito dos EHC e EHF era extensivo a outros tipos de reações inflamatórias, submetemos os extratos ao modelo de pleurisia alérgica em camundongos. Estudos demonstram que o desafio com ovoalbumina induz um aumento significativo no número de leucócitos totais na cavidade pleural dentro de 24 h, com um importante acúmulo de eosinófilos (VIEIRA-de-ABREU et al., 2005). Neste ensaio, verificamos que o desafio com ovoalbumina em animais ativamente sensibilizados induziu em 24 h um expressivo aumento no número total de leucócitos na cavidade pleural refletido pelo intenso acúmulo de eosinófilos. No entanto, o pré-tratamento com EHC foi capaz de reduzir o influxo de eosinófilos para o espaço pleural em animais alérgicos desafiados antígenicamente. De modo contrário, o tratamento prévio com EHF não foi capaz de interferir com a mobilização de eosinófilos nesta condição. Em conjunto, estes dados sugerem que os extratos possuem substâncias diferentes e que provavelmente estão atuando em alvos inflamatórios distintos.

Os eosinófilos são células produzidas em quantidades significativas somente em situações específicas, tal como alergia. Mesmo ainda não estando completamente esclarecido todas as etapas responsáveis pela eosinofilia tecidual induzida pelo estímulo alérgico, sabe-se que algumas moléculas estão diretamente envolvidas no controle deste processo, tais como IL-5 e CCL11 (eotaxina). A IL-5 é uma das principais citocinas produzidas na resposta alérgica inicial e está envolvida na produção de eosinófilos na medula óssea, indução da sua migração para o pulmão e aumento da sua atividade e sobrevivência no sítio inflamatório (FERREIRA, 2003; 2004). Estudos prévios revelam que no modelo de pleurisia alérgica o estímulo alérgico promove uma intensa produção de CCL11 após 6 h, e que tal fenômeno mostra-se diretamente relacionado com a eosinofilia tecidual que ocorre 24 h após o desafio alérgico (SILVA et al., 2001). Portanto, com o propósito de investigar a possível interferência do EHC na produção destes mediadores, avaliamos os níveis de expressão de RNAm destas proteínas na condição alérgica submetida ao tratamento com o extrato. Assim, verificamos que o tratamento prévio com EHC foi capaz de suprimir a expressão destes genes relacionados à

ativação/recrutamento de eosinófilos. Sugerindo que este possa ser um dos mecanismos responsáveis pelo menor recrutamento de eosinófilos quando é feito o tratamento com o extrato. Sustentando estes achados, diferentes autores relatam que a menor expressão de RNAm para IL-5 e CCL11 está diretamente relacionada com o menor influxo de eosinófilos para dentro da cavidade pleural de camundongos após desafio antigênico (EUM et al., 2005; SEHMI et al., 2003). Nossos dados são similares com os resultados apresentados por Penido et al (2006), que testando um produto natural no modelo de pleurisia alérgica por ovoalbumina, observou que a inibição no recrutamento de eosinófilos para a cavidade pleural estaria relacionada com uma provável capacidade deste produto em suprimir a expressão destes mediadores eosinofilotáticos.

Com o propósito de avaliar o efeito do EH em situações de inflamação crônica, foi investigado o efeito destes extratos sobre a formação do granuloma induzido por implante de algodão. A inflamação crônica é uma reação que surge quando a resposta aguda é insuficiente para eliminar agentes pró-inflamatórios. A reação crônica inclui uma proliferação de fibroblastos e a infiltração de neutrófilos e exsudação. O modelo de formação de granuloma induzido por implante de algodão caracteriza uma reação inflamatória crônica estabelecida e pode ser usado como modelo padrão em respostas inflamatórias crônicas e subcrônicas para a investigação de substâncias antiartríticas (ZHANG et al., 2008; RATHI et al., 2004). O EHC mostrou uma significativa inibição na formação do granuloma induzido por implantes de algodão, sugerindo que este extrato possui substâncias capazes de interferir com diferentes processos de formação granulomatosa, tais como inibição do aumento no número de fibroblastos e/ou síntese de colágeno durante a formação do tecido granulomatoso. Entretanto, o EHF não foi capaz de reduzir de maneira significativa a formação do tecido granulomatoso, resultado que reforça a hipótese de diferenças na composição química dos extratos testados.

Preparações de *C. nemorosa* são usadas popularmente no alívio da dor e sintomas inflamatórios. As evidências obtidas neste trabalho dão suporte ao uso popular das cascas e folhas de *C. nemorosa*. Tais resultados também indicam possibilidades reais para que esta planta seja utilizada como fonte para obtenção de compostos ativos, cuja pesquisa aprofundada pode levar à descoberta de uma nova e melhor alternativa terapêutica aos estados patológicos com quadro inflamatório agudo e crônico.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados podemos concluir que:

- Os EHF e EHC foram capazes de inibir o recrutamento de neutrófilos no modelo de inflamação não-alérgica, fenômeno que parece envolver a inibição da produção de TNF-alfa.
- No modelo de quimiotaxia *in vitro*, apenas o EHF mostrou-se capaz de inibir a migração dos neutrófilos humanos induzido por CXCL1 indicando seus efeitos diretos sobre as células.
- No ensaio de apoptose, ambos os extratos não induziram morte celular inicial ou tardia, demonstrando que seus efeitos antiinflamatórios não são devido à indução de citotoxicidade.
- Na inflamação alérgica, apenas EHC mostrou-se eficaz em inibir o recrutamento eosinofílico induzido por antígeno, fenômeno que se mostrou relacionado com a inibição de fatores eosinofilotáticos, tais como IL-5 e CCL11.
- EHC mostrou-se capaz de suprimir a formação do granuloma no modelo de inflamação crônica, o que sugere a presença de substâncias capazes de atuarem não apenas em eventos inflamatórios agudos.

Juntos, estes resultados apontam o potencial antiinflamatório do extrato hexânico de *C. nemorosa*, sendo esta uma espécie promissora para obtenção de princípios ativos com atividade antialérgica.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2008.

AGRA, M. de F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 18 (3): 472-508, jul/set. 2008.

ALWANI, M.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacol Ther.** 112 (1):171-83, oct. 2006.

ANDRADE, V. C. **O gênero Clusia no Estado de Pernambuco (Brasil)**. Recife: Tese de Mestrado, 1987.

ANDRADE VC, MARIZ G, CAVALCANTI LH, ANDRADE LHC. Distribuição das espécies do gênero *Clusia* em Pernambuco. In: **Tabarelli M & Silva JMC**. Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco, Recife. Pernambuco: sectma – fundaj. 2002.

ANDRADE-LIMA D, MAULE AF, PEDERSEN TM, RAHN K. Marcgrave Brazilian Herbarium Collected 1638-44. **Botanisk Tidsskrift**, 71: 121-160. 1977.

ANDRADE, M. R.; ALMEIDA, E. X.; CONSERVA, L. M. Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, 47(7): 1431-1433, 1998.

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

BANDEIRA-MELO, C.; SERRA, M.F.; DIAZ, B.L.; CORDEIRO, R.S.; SILVA, P.M.; LENZI, H.L.; BAKHLE, Y.S.; SERHAN, C.N.; MARTINS, M.A. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic Edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia. **J. Immunol.** 164: 1029-1036, 2000.

BAUTISTA, L. E. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence. **J Hum Hypertens**, 17 (4): 223-30, 2003.

BASSO, L. A.; DA SILVA, L. H.; FETT-NETO, A. G.; DE AZEVEDO JR., W. F.; MOREIRA IDE, S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; ASTOLFI FILHO, S.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases . **A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz.** 100: 475-506, 2005.

BELVISI, M. G. Regulation of Inflammatory Cell Function by Corticosteroids. **Proc Am Thorac Soc.** 1: 207-214, 2004.

BITTAR, M.; DE SOUSA, M. M.; YUNES, R. A.; LENTO, R.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive activity of 13, I18-binaringenin, a biflavonoid present in plants of the guttiferae. **Planta Med.**, 66: 84-86, 2000.

BOCHNER, B. S.; BUSSE, W. W. Advances in mechanisms of allergy. **J Allergy Immunol.** 113: 868-875, 2004.

BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs central and peripheral sites. **Pharmacol Ther.** 107: 139-154, 2005.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Natrally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother Res.** 14: 401-418, 2001.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F. ; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origen. Parte II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.** 69: 973-985, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol.** 100 (1-2): 131-134, august, 2005.

CAILHIER, J. F.; SAWATZKY, D. A.; KIPARI, T.; HOULBERG, K.; WALBAUM, D.; WATSON, S.; LANG, R. A.. CLAY, S.; KLUTH, D.; SAVILL, J. and HUGHES, J. Resident Pleural Macrophages are Key Orchestrators of Neutrophil Recruitment in Pleural Inflammation. **Am. J. Resp. Critical Care Med.** 173: 540-547, 2006.

COHN, L.; ELIAS, J. A.; CHUPP, G. L. ASTHMA: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. **Ann. Rev. Immunol.** 22: 789-815, 2004.

COOKSON, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. **Nature Rev. Immunol.** 4: 978-988, 2004.

CÔRREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, p. 318-337, 1984.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

DALMARCO, E. M.; MEDEIROS, Y. S.; FRODE, T. S. Cyclosporin A inhibits CD11a/CD18 adhesion molecules due to inhibition of TNF- α and IL-1 β levels in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. **Cell Adhesion & Migration**, 2 (4): 231-235, 2008.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTOLO, G. B.; ALVES DE LIMA, R. Chemical investigation of the genus *Rheedia* I Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **J Nat Prod.** 46: 655, 1983.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; WATERMAN, P. G.; CRICHTON, E. G.; ALVES DE LIMA, R. Minor Xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, 23: 1757-1759, 1984.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; MOURA PINHEIRO, R.; RADICS L. Chemistry of *Clusia* genus. 3. Nemorosonol, a derivative of tricyclo-[4.3.1.0^{3,7}]-decane-7-hydroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, 27: 2305-2308, 1988.

DELLE MONACHE, F. Nemorosonol B, a polyisoprenylated alkyl-aryl ketone from *Clusia nemorosa*. **Bull Chem. Soc. Ethiopia**, 4: 67-69, 1990.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; GACS-BAITZ, E. Two isoprenylated ketones from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, 30: 703-705, 1991.

EUM, S. Y.; MAGHNI, K.; TOLLOCZKO, B.; EIDELMAN, D. H.; MARTIN, J. G. IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 288: L576-584, 2005.

FELDMANN, M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, 2: 364–371, 2002.

FERREIRA, M. A. R. Inflammation in allergic asthma: Initiating events, immunological response and risk factors. **Respirology**. 9: 16-24, 2004.

FERREIRA, M. A. R. Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of *in vivo* challenge studies. **Mediators of inflammation**. 12(5): 259-267, 2003.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance?. **JEM**. 201 (5): 671–674, march, 2005.

FOLKERTS, G.; KRANEVELD, A. D.; NIJKAMP, F. P. New endogenous CXC chemokine ligands as potential targets in lung emphysema. **Trends Pharmacol Sci**. 29: 181-185, 2008.

FRODE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, 13 (3): 162-168, 2001.

FRUTUOSO, V. da S.; MONTEIRO, M. M.; AMENDOEIRA, F. C.; ALMEIDA, A. L. F.; NASCIMENTO, D. D.; BERENGER, A. L. R.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C. Analgesic and anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Rheedia longifolia* Planch & Triana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 102 (1): 91-96, 2007.

GILROY, D. W.; BLACKWELL, N. M.; SEMBI, P.; NEWSON, J. S.; LAWRENCE, T.; KABOURIDIS, P. S. Reduced Infiltration and Increased Apoptosis of Leukocytes at Sites of Inflammation by Systemic Administration of a Membrane-Permeable I B Repressor. **Arthritis Rheum**. 50 (8): 2675–2684, august. 2004.

GOMPERTZ, S.; OBRIEN, C.; BAYLEY, D. L.; HILL, S. L.; STOCKLEY, A. R. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. **Eur Respir. J**. 17: 1112-1119, 2001.

GRUNDY, S. M. Inflammation, hypertension, and the metabolic syndrome. **JAMA**, 290 (22): 3000-2, 2003.

GUPTA, M.; MAZUMDAR, U. K.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L. M.; KARKI, S. S.; SAMBATHKUMAR, R.; MANIKANDAN, L. Evaluation of Anti-inflammatory Activity of Chloroform Extract of *Bryonia laciniosa* in Experimental Animal Models. **Biol. Pharm. Bull.** 26 (9): 1342-1344, 2003.

GUSTAFSON, K. R.; MUNRO, M. H. G.; FULLER, R. W.; CARDELLINA, J. H. The Guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *G. ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, 48: 10093-10102, 1992.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J. and CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation?. **Braz J. Med. Biol. Res.** 20: 243-249, 1987.

HERRICK, C. A.; BOTTOMLY, K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. **Nature Rev. Immunology**. 3: 1-8, 2003.

HILARIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **J Pediatr.** (Rio J), 85 (5): S206-12, 2006.

ISSEKUTZ, A. C.; CHULUYAN, H. E.; LOPES, N. CD11/CD18-independent transendothelial migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes: involvement of distinct and unique mechanisms. **J. Leukoc. Biol.** 57: 553–561, 1995.

JOHNSTON, B.; BUTCHER, E. C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and Migration. **Seminars in Immunology**, 14: 83–92, 2002.

JUDD WS, CAMPBELL CS, KELLOG EA, STEVENS PF. Plant Systematics – a phylogenetic approach. **Sunderland, Massachusetts**: Sinauer Associates, Inc. 1999.

KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 120 (1): 3-10, July, 2007.

KOLACZKOWSKA, E.; KOZIOL, A.; PLYTYCZ, B.; ARNOLD, B. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. **Immunobiology**, doi: 10.1016, July, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins Patologia Básica**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008.

LAMPIENEN, M.; CARLSON, M.; HAKANSSON, L. D.; VENGUE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammation disease. **Allergy**. 59: 793-805, 2004.

LARCHÉ, M.; ROBINSON, D. S.; KAY, B. The role of T lymphocytes in pathogenesis of asthma. **J Allergy Clin. Immunol.** 111: 450-463, 2003.

LEUNG, D. Y. M. Molecular Basis of Allergic Diseases. **Molecular Genetics and Metabolism**, 63: 157-167, 1998.

LI, J. J.; CHEN, J. L. Inflammation may be a bridge connecting hypertension and atherosclerosis. **Med Hypotheses**, 64 (5): 925-9, 2005.

LOPES, A.V.; MACHADO, I.C. Floral biology and reproductive ecology of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, 213: 71-90, 1998.

LUKACS, N. W. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. **Nature Rev. Immunol.** 1: 108-116, 2001.

MAZZON, E.; CUZZOCREA, S. Role of TNF- α in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. **Respiratory Research**, 8:75, 2007.

MATYSIAK-BUDNIK, T.; HEYMAN, M. Food allergy and *Helicobacter pylori*. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 34 (1): 5-12, jan. 2002.

MELO, S. E. S. F. C.; YUGAR-TOLEDO, J. C.; COCA, A. P.; MORENO JÚNIOR, H. Hipertensão arterial, aterosclerose e inflamação: o endotélio como órgão-alvo. **Rev Bras. Hipertensão**. 14 (4): 234-238, 2007.

MESQUITA RCG, FRANCISCON CH. Flower visitor of *Clusia nemorosa* in na amazonian White-sand campina. **Biotropia**, 27:254-258. 1995.

MICHELIN, A. de F.; FERREIRA, A. A. P.; BITAR, V. G.; LOPES, L. C. Toxicidade renal de inibidores seletivos da ciclooxigenase-2: celecoxib e rofecoxib. **Rev. Ciênc. Méd., Campinas**, 15 (4): 321-332, jul./ago., 2006.

MINAMI, H.; TAKAHASHI, E.; KODAMA, M.; FUKUYAMA, Y. Three xanthones from *Garcinia subelliptica*. **Phytochemistry**, 41: 629-633, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov/medicamentos/fitoterapicos/definicao.ht>. Acessado em 2009.

NATHAN, J. D.; LIDDLE, R. A. Neurohormonal control of pancreatic exocrine secretion. **Curr Opin Gastroenterol**. 18(5): 536-44, sep. 2002.

NEVES, J. S.; COELHO, L. P.; CORDEIRO, R. S.; VELOSO, M. P.; RODRIGUES e SILVA, P. M.; DOS SANTOS, M. H.; MARTINS, M. A. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Thieme e Journals – Plant Medicine**. 73 (7): 644-649, jun., 2007.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends Immunol**. 26: 157-165, 2005.

OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO, A. M.; BITTTRICH, I. V.; MARSALOLI, A. J. Floral serin of *Clusia SSP.*: chemical composition and biological function. **Tetrahedron Letters**, 37: 6427-3430, 1996.

OLIVEIRA DE MELO, J.; DA CONCEIÇÃO, T. T. M.; MUSCARÁ, M. N.; BOLONHEIS, S. M.; DANTAS, J. A.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K.; BERSANI-AMADO, C. A. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biol Pharm Bull**. 29 (11): 2241-2245, 2006.

PAWANKAR, R. Inflammatory mechanisms in allergic rhinitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, 7: 1-4, 2007.

PENIDO, C.; COSTA, K. A.; COSTA, M. F. S.; PEREIRA, J. F. G.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NF- κ B activation. **International Immunopharmacology**, 6: 109-121, 2006.

PLANCHON J, TRIANA J. Memoire sur La famille dês Guttiferes. **Annales des Sciences Naturelles**. Paris. 1860. In: Andrade VC. O gênero *Clusia* no Estado de Pernambuco (Brasil). Recife: Tese de Mestrado 1987.

RANG, H. P. **Rang & Dale Farmacologia**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007.

RATHI, A.; RAO, C. V.; RAVISHANKAR, B.; DE, S. MEHROTRA, S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of the water decoction *Desmodium gangeticum*. **Journal of Ethnopharmacology**, 95: 259-263, 2004.

RICHARDS, K.L.; MCCULLOUGH, J. A modified micro-chamber method for chemotaxis and chemokinesis. **Immunol. Commun.** vol. 13: 49-62, 1984.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol.** 18: 217-42, 2000.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M. A.; STOECKLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from hypericum brasiliense. **Phytochemistry**, 36: 1381-1385, 1994.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Ann. Rev. Immunol.** 24: 147-174, 2006.

SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia**, 71 (1): 48-57, august, 2000.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biom. Eng.** 8: 93-1551, 2006.

SEHMI, R.; DORMAN, S.; BAATJES, A.; WATSON, R.; FOLEY, R.; YING, S.; ROBINSON, D. S.; KAY, A. B.; O'BYRNE, P. M.; DENBURG, J. A. Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. **Immunology**, 109: 536-546, 2003.

SHAKOORY, B.; FITZGERALD, S. M.; LEE, S. A.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. **J Interferon Cytokine Res.** 24 (5): 271-281, may, 2004.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response, Best. **Practi & Res Clin Anaesthesiol**, 18 (3): 385-405, 2004.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

SILVA, P. M.; ALVES, A. C.; SERRA, M. F.; PIRES, A. L.; SILVA, J. P.; BARRETO, E. O.; CORDEIRO, R. S.; JOSE, P. J.; TEIXEIRA, M. M.; LAGENTE, V.; MARTINS, M. A. Modulation of eotaxin formation and eosinophil migration by selective inhibitors of phosphodiesterase type 4 isoenzyme. **Br. J. Pharmacol.** 134: 283-294, 2001.

SOLE, D.; WANDALSEN, G. F.; NUNES, I. C. C.; NASPITZ, C. K. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase 3. **J Pediatr.** (Rio J). 82 (5): 341-346, 2006.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, 76: 301-314, 1994.

SOUSA, L. P.; LOPES, F.; SILVA, D. M.; TAVARES, L. P.; VIEIRA, A. T.; REZENDE, B. M.; CARMO, A. F.; RUSSO, R. C.; GARCIA, C. C.; BONJARDIM, C. A.; ALESSANDRI, A. L.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF- κ B-independent manner. **Journal of Leukocyte Biology**, 87: 1-10, 2010.

SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L.; NEPOMUCENO, D. C.; YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts - Clusiaceae. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 101: 287-290, 2006.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. Compêndio de Fitoterapia. **Herbarium**, 1997.

TREPELS, T.; ZEIHNER, A. M.; FICHTLSCHERER, S. The endothelium and inflammation. **Endothelium**, 13 (6): 423-9, 2006.

VIANA, A. F.; HECKLER, A. P.; FENNER, R.; RATES, S. M. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Braz J Med Biol Res.** 36: 631- 634, 2003.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration during endotoxemia. **Journal of Leukocyte Biology**, 66, July. 1999.

ZHANG, Z.; LUO, P.; LI, J.; YI, T.; WANG, J.; AN, J.; ZHANG, H. Comparison of the Antiinflammatory Activities of Three Medicinal Plants Known as "Meiduoluomi" in Tibetan Folk Medicine. **Yakugaku Zasshi**, 128 (5): 805-810, 2008.