

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENADORIA ESPECIAL DE FARMACOLOGIA

**Avaliação das atividades antinociceptivas e
antiinflamatórias de extrato, frações, sub-frações e
compostos isolados de *Wilbrandia ebracteata* Cogn.**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria
Ribeiro do Valle Nicolau.

Co-orientadora: Profa. Dra. Mareni
Rocha Farias

RODRIGO REBELO PETERS

Florianópolis
1997

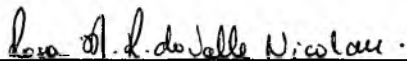
**“AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVAS E
ANTIINFLAMATÓRIAS DE EXTRATO, FRAÇÕES, SUB-FRAÇÕES E
COMPOSTOS ISOLADOS DE *WILBRANDIA EBRACTEATA* COGN.”**

POR

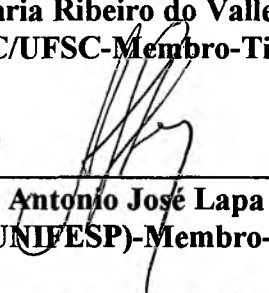
RODRIGO REBELO PETERS

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros da
Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



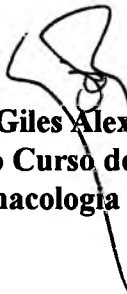
**Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau
(FMC/UFSC-Membro-Titular)**


Antonio José Lapa

(EPM/UNIFESP)-Membro-Titular)


João Batista Calixto

(FMC/UFSC)-Membro Titular)


**Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, outubro de 1997.

*Aos meus pais, Celso Peters e Inez Rebelo Peters pela
minha formação e pelo amor a mim dedicados. E à
minha irmã, Madelon, pelo carinho que nos une.*

*À minha pequena grande noiva,
Deise Elisa Cenci, pelo carinho, incentivo, paciência e
pelo nosso amor.*

*À Prof. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau,
pelo grande laço de amizade, pela chance de crescer, pela
minha formação científica, por ter acreditado em mim.*

"Relax baby"

AGRADECIMENTO

Aos Professores do Departamento de Farmacologia e em especial a Dra. Yara dos Santos Medeiros, pela colaboração e valiosas sugestões.

Agradecimento especial à Profa. Dra. Marení Rocha Farias do Departamento de Ciências Farmacêuticas, pelo incentivo, amizade e pela magnífica co-orientação.

Ao Prof. Dr. Artur J. de Brum Fernandes, pela amizade, colaboração e pela oportunidade de trabalho em seu laboratório que proporcionou estágio na Unité des maladies rhumatismales, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

Aos amigos Max e Caroline (Sherbrooke), pelo apoio no laboratório e a Sr. Carmen e Nanci (Sherbrooke) pela acolhida.

A Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões do Departamento de Ciências farmacêuticas, por suas valiosas sugestões.

Aos amigos de turma Anna Paula, Karina, Solange, Patrícia e Sandro, pelo nosso ótimo convívio.

Aos amigos do Curso de Pós-graduação em especial à Tânia Saleh, pelo grande apoio, troca de informações e disposição em ajudar.

Ao Marco Antônio da Silva, pela grande amizade.

Aos amigos do laboratório Elke, Melani, Beth, pela nossa união e pelo excelente clima de trabalho, em especial à Karina Ckless pela troca de idéias e sugestões e ao Geisson Nardi pela grande ajuda.

Aos amigos: Pedro, Juarez, Rita, Goretti, Adenir, Regina e Vílma. Em especial à Elza e Jô pela amizade e auxílio.

Aos futuros familiares Sr. Iraci, Sra. Joece e ao Nabor pelo incentivo e constante apoio.

Aos amigos Heitor, Gero, Dudí, Renato, Evandro, Aga, Queijo, Marco e Guti (in memoriam), porque seremos sempre 10.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo concedida.

E a todos as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao São Bento pela proteção

Ao Todo Poderoso pela força e luz transmitida

*Obrigado do fundo do
meu coração*

Rodrigo

*“Viver como se fosse morrer amanhã,
estudar como se fosse viver sempre”
(Sto. Isídoro de Servilha)*

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	i
Lista de figuras	iii
1. Introdução.....	01
1.1. Revisão bibliográfica.....	05
1.1.1. Família Cucurbitaceae.....	05
1.1.2. <i>Wilbrandia ebracteata</i> Cogn	07
1.1.3. Propriedades farmacológicas de algumas cucurbitacinas	11
1.1.4. Processo inflamatório	14
1.1.4.1. As prostaglandinas	19
2. Objetivos.....	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Animais.....	31
3.2. Material botânico	32
3.3. Fracionamento e isolamento dos princípios ativos de <i>W. ebracteata</i>	33
3.4. Protocolos experimentais “ <i>in vivo</i> ”	36
3.4.1. Atividade Geral – Toxicidade aguda e DL ₅₀ em camundongos	36
3.4.2. Atividade Antinociceptiva.....	37
3.4.2.1. Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos	37
3.4.2.2. Teste da formalina em camundongos	38
3.4.2.3. Teste do <i>Tail – Flick</i> em camundongos	39
3.4.3. Atividade antiinflamatória.....	40
3.4.3.1. Teste do edema de pata induzido pela carragenina em ratos	40
3.4.3.2. Teste do edema de pata induzido pela carragenina em ratos adrenalectomizados.....	42
3.4.3.3. Teste da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos	42

3.4.3.4. Dosagem dos níveis de PGE ₂ no exsudato induzido pela carragenina na cavidade pleural de camundongos	44
3.4.3.5. Avaliação dos efeitos da F – CH ₂ Cl ₂ <i>W. ebracteata</i> sobre a mucosa gástrica de ratos	46
3.5. Protocolos experimentais “ <i>in vitro</i> ”	47
3.5.1. Estudo do efeito da F – CH ₂ Cl ₂ e FP-III de <i>W. ebracteata</i> sobre a atividade da ciclooxigenase humana-2 (hCOX-2)	47
3.5.1.1. Cultura celular	47
3.5.1.2. Preparação do plasmídeo	47
3.5.1.3. Transfecção transitória	48
3.5.1.4. Infecção com Virus Vaccinia recombinante inserido em bacteriófago T7 RNA polimerase	50
3.5.1.5. Ensaio de inibição da atividade enzimática da ciclooxigenase humana-2 (hCOX-2)	51
3.6. Análise estatística	52
3.7. Drogas e reagentes	53
4. Resultados	54
4.1. Estudos farmacológicos e bioquímicos “ <i>in vivo</i> ”	54
4.1.1. Atividade Geral – Toxicidade aguda e DL ₅₀ em camundongos	54
4.1.2. Atividade Antinociceptiva	56
4.1.2.1. Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos	56
4.1.2.2. Teste da formalina em camundongos	60
4.1.2.3. Teste do <i>Tail – Fiick</i> em camundongos	64
4.1.3. Atividade Antiinflamatória	65
4.1.3.1. Teste do edema de pata induzido pela carragenina em ratos	65
4.1.3.2. Efeito da F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> no teste do edema de pata induzido pela carragenina – avaliação da participação dos glicocorticóides endógenos em ratos	73
4.1.3.3. Teste da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos	76

4.1.3.4. Dosagem dos níveis de PGE ₂ no exsudato pleural, induzido pela carragenina em camundongos	81
4.1.3.5. Avaliação dos efeito da F – CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> sobre a mucosa gástrica de ratos.....	84
4.2. Estudos bioquímicos “ <i>in vitro</i> ”	86
4.2.1. Estudo do efeito da F – CH ₂ Cl ₂ e FP-III de <i>W. ebracteata</i> sobre a atividade da ciclooxigenase humana 2(hCOX-2)	86
5. Discussão	88
6. Sumário e conclusões.....	102
7. Summary and conclusions.....	106
8. Referências bibliográficas.....	110

LISTA DE ABREVIÇÕES

5-HEPE	5-ácido hidroperoxidoeicosatetraenoico
5-HT	Serotonina
AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilato ciclase
ADH	Hormônio antidiurético
AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
CEC	Células enterocromafins
CGRP	Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
cpm	cintilação por minuto
DE ₅₀	Dose efetiva necessária para obter 50% do efeito máximo
DI ₅₀	Dose necessária para inibir 50% do efeito máximo causado pelo agonista
DL ₅₀	Dose necessária para matar 50% dos animais
EPM	Erro padrão da média
F-AcOEt	Fração acetato de etila
F-CH ₂ Cl ₂	Fração diclorometano
F-H ₂ O	Fração aquosa
F-n-BuOH	Fração n-butanólica
FP	Fração purificada
h	hora
Hist	Histamina
i.p.	Via intraperitoneal
IC	Intervalo de confiança
IFN	Inteferon
IL	Interleucina

IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IU	Índice de ulceração
LT	Leucotrienos
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MPLC	Medium performance liquid chromatographic
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator de agregação plaquetária
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGHS	Prostaglandina H sintase
PGHS-1	Prostaglandina H sintase 1
PGHS-2	Prostaglandina 2 sintase
PGI ₂	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
s	segundo
TNF	Fator de necrose tumoral
TXA ₂	Tromboxano A ₂
v.o.	Via oral
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esqueleto básico das cucurbitacinas e substâncias	09
Figura 2. Conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas	20
Figura 3. Regulação da secreção gástrica pelas prostaglandinas	22
Figura 4. Proposta de via separadas para a biossíntese de prostaglandinas	26
Figura 5. Inibidores de COX-1 e COX-2	29
Figura 6. Folhas e raízes de <i>W. ebracteata</i>	32
Figura 7. Representação do esquema de fracionamento e isolamento das frações e dos compostos de <i>W. ebracteata</i>	34
Figura 8. Estruturas químicas da cucurbitacina B, dihidrocucurbitacina b e cucurbitacina E.....	35
Figura 9. Representação esquemática do procedimento de transfecção transitória	49
Figura 10. Representação esquemática da infecção com o vírus vaccinia recombinante inserido em bacteriófago T7 RNA polimerase	50
Figura 11. Regressão linear do número de mortes induzidas pela F-CH ₂ Cl ₂	55
Figura 12. Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	57
Figura 13. Perfil temporal da atividade antinociceptiva produzida pela F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i>	59
Figura 14. Efeito antinociceptivo promovido pela F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> administrada por via i.p. em camundongos	62
Figura 15. Efeito antinociceptivo promovido pela F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> administrada por v.o. em camundongos.....	63

Figura 16. Efeito antiedematogênico induzido pela F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> administrada por via i.p. em ratos.....	67
Figura 17. Efeito antiedematogênico induzido pela F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> administrada por v.o. em ratos	69
Figura 18. Efeito antiedematogênico induzido pela F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> administrada por via i.p. em ratos adrenalectomizados.....	74
Figura 19. Efeito antiinflamatório induzido pela F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> administrada por via i.p. em camundongos	78
Figura 20. Efeito antiinflamatório induzido pela F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> administrada por v.o. em camundongos.....	79
Figura 21. Efeito da administração de F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> sobre os níveis de PGE ₂ induzidos pela carragenina em camundongos	82
Figura 22. Registro fotográfico típico dos efeitos causados pela indometacina de pela F-CH ₂ Cl ₂ de <i>W. ebracteata</i> na mucosa gástrica de ratos.....	85
Figura 23. Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2	87

1. INTRODUÇÃO

Plantas, animais e minerais têm sido usados historicamente por toda a civilização humana para fazer remédios curativos. Registros escritos como os antigos hieróglifos egípcios, os manuais chineses de fitoterapia e a Bíblia descrevem o uso extensivo de produtos naturais para fins medicinais. Até hoje a natureza continua a ser uma grande fonte de medicamentos para a humanidade. Na Inglaterra e nos Estados Unidos, por exemplo, quase 25% dos compostos ativos de medicamentos correntemente prescritos foram inicialmente identificados em plantas superiores (Brown, 1994). Poucos dados existem sobre o comércio de fitoterápios ou plantas medicinais. Dados obtidos do IMS (Institute of Medical Statistics, 1994) e do *The Herbal Medical Data Base* em 1993 indicam que nos países desenvolvidos, os fitoterápicos movimentam cerca de 12 bilhões de dólares anuais, onde \$6 bilhões são comercializados na Europa, \$2.1 bilhões no Japão, \$2.3 bilhões no resto da Ásia, e aproximadamente \$1.5 bilhões na América do Norte (Grünwald, 1995).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da humanidade não tem acesso à medicina ocidental, seja por habitar longe dos centros urbanos, seja por não poder pagar um tratamento medicamentoso. Além disto, os inúmeros efeitos colaterais associados tanto ao uso correto quanto indevido dos medicamentos sintéticos, além da incapacidade dos modernos recursos terapêuticos em tratar eficazmente inúmeras doenças, proporcionaram, nos últimos anos, um incremento considerável na utilização de produtos naturais. As razões sócio-econômicas para a substituição de fármacos industrializados por plantas já são bem conhecidas e esta

prática não se restringe apenas a zonas rurais ou regiões desprovidas de assistência médica e farmacêutica (Moerman, 1991, Simões *et al.*, 1986).

O uso de espécies vegetais, com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas, remonta ao início da civilização, desde o momento em que o homem despertou para a consciência e começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação destes recursos para seu próprio benefício.

Esta prática milenar, atividade humana por excelência, ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz.

Muitas descobertas foram feitas durante a procura de novas fontes de alimentos, mas provavelmente um número significativo foi devido à curiosidade e ao desejo natural de investigação do ser humano. Inúmeros médicos gregos utilizavam plantas medicinais, entre eles pode-se destacar Dioscórides (séc. II, a. C.), que escreveu um livro chamado "De materia medica libri cinque", onde descreveu o uso de mais de 600 plantas, além de inúmeras substâncias de origem animal e mineral, que foram a base das farmacopéias durante 16 séculos (Silva, 1973).

Durante um longo período, as plantas medicinais constituíram a base da terapêutica e, somente em meados do século passado é que as substâncias puras isoladas ou sintetizadas foram incorporadas ao arsenal terapêutico. Entre as plantas mais conhecidas popularmente e que contribuíram para o desenvolvimento da Farmacologia pode-se mencionar a papoula (*Papaver somniferum* - opiáceos), a quina (*Cinchona ledgeriana* - quinina), a digitalis ou dedaleira (*Digitalis purpurea* e *D. lanata* – digitoxina e digoxina), a beladona (*Atropa belladonna* – atropina), o café e o chá (*Coffea arabica* e *Thea sinensis* – cafeína e teofilina), a coca (*Erythroxylon coca*

- cocaína), o tabaco (*Nicotiana tabacum* – nicotina), o jaborandi (*Pilocarpus jaborandi* ou *Pilocarpus microphyllus* - pilocarpina), o curare (*Chondrodendron tomentosum*) entre outros (Silva, 1973; Budavari, 1996).

Nos últimos 20 anos o interesse pelas plantas medicinais tem-se elevado intensamente na sociedade ocidental e em todos os seus níveis, desde o uso dos produtos naturais como medicamentos utilizados pela população até as investigações científicas sobre os efeitos biológicos de plantas medicinais nos seres humanos. As plantas medicinais parecem ser os substratos ideais para a obtenção de um medicamento inovador, pois são insumos acessíveis e naturalmente valorizados, isto é, já têm, pela aceitação popular, um alto valor agregado que facilita a aderência terapêutica e a competitividade de marcas. Um exemplo científico incontestável da utilização de fitoterápicos é a incorporação de medicamentos inovadores à base de ginkgo-biloba (Tanakan® e Tebonin®) um dos fitoterápicos mais vendidos na Europa, com específica atividade antagonista do fator de agregação plaquetária. Ainda se pode citar um derivado do taxol, o paclitaxel (Taxol®), usado no tratamento do câncer de ovário e de mama, além de outras drogas, também anticâncer, tais como: vincristina (Oncovin®), vinorelbina (Navelbine®), teniposida (Vumon®), topotecan (Hycamtin®) (Pezzuto, 1997). Ainda como exemplos podem ser citados alguns compostos de origem vegetal aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), como por exemplo o Marinol® (tetraidrocanabinol – *Cannabis sativa*) usado como antiemético para pacientes em quimioterapia e como estimulante do apetite para pacientes adéticos, este é um medicamento controlado e está listado no Código de Regulação Federal dos Estados Unidos (Budavari, 1996).

Existe uma controvérsia devido principalmente à imprecisão de dados e da falta de pesquisa sobre o número de espécies vegetais existentes no Brasil. Estima-se que a flora brasileira possui cerca de 40 a 55 mil espécies (Farnsworth e Soefarto, 1991; Ming, 1996). Segundo Plotkin (1991) o Brasil é o país com maior número de espécies no mundo. Nos últimos 20 anos, as pesquisas pré-clínicas e clínicas na área de produtos naturais por parte de órgãos governamentais, fundações, empresas nacionais e grandes empresas estrangeiras têm aumentado as possibilidades de desenvolvimento de novos medicamentos. Estes estudos demonstram o grande potencial econômico e tecnológico que a flora brasileira representa, exigindo, por outro lado, preocupações adicionais quanto à preservação destes recursos naturais.

No presente trabalho objetivou-se o estudo farmacológico de uma planta medicinal, visando verificar cientificamente, através de ensaios pré-clínicos, algumas propriedades terapêuticas preconizadas popularmente. Além disso, foram investigados os possíveis constituintes químicos responsáveis por estas ações. Estes estudos representam os primeiros passos, os quais são determinantes para estudos mais aprofundados visando ao desenvolvimento de novos medicamentos. Para tanto, escolheu-se a espécie *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (*W. ebracteata*) da família Cucurbitaceae, conhecida popularmente como taiuiá. As raízes desta espécie são empregadas na medicina popular no tratamento de doenças reumáticas, afecções da pele, como laxante, etc.

Tendo por base as indicações populares, os dados da literatura sobre esta espécie vegetal, bem como os resultados farmacológicos preliminares realizados com o extrato bruto, indicando uma ação antinociceptiva e antiedematogênica,

procurou-se investigar as possíveis atividades analgésica e antiinflamatória de extratos, frações e subfrações e compostos das raízes de *W. ebracteata*.

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir será apresentada uma revisão bibliográfica sobre a família Cucurbitaceae, a espécie *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (*W. ebracteata*) e as atividades farmacológicas das cucurbitacinas em geral, seguida por uma revisão do processo inflamatório e as novas abordagens sobre as prostaglandinas.

1.1.1. FAMÍLIA CUCURBITACEAE

A família das Cucurbitaceae Juss. compreende várias espécies utilizadas na medicina popular, porém algumas delas apresentam elevada toxicidade. Outras espécies, utilizadas na alimentação, possuem grande importância agrônômica (Hoehne, 1939; Pio Corrêa, 1926 – 1978). No Brasil, a família é representada por cerca de 30 gêneros, com um total de 200 espécies (Klein, 1990), das quais 36 são citadas como medicinais, principalmente na literatura do século passado e início deste (Castro, 1879; Schindler, 1884; Silveira, 1889; Hoehne, 1920, 1939; Silva, 1923; Pio-Corrêa, 1926–1978; Peckolt, 1937). As indicações terapêuticas mais comuns atribuídas às espécies de Cucurbitaceae são como laxantes, anti-helmínticas, anti-reumáticas, anti-sifilíticas, em afecções da pele, contraceptivas ou abortivas e como iscas biológicas, por sua propriedade de atratividade de insetos.

Estudos fitoquímicos demonstraram que os principais representantes do metabolismo secundário desta família são cucurbitacinas, saponinas triterpênicas, óleos fixos contendo ácidos triênicos conjugados e aminoácidos não-protéicos, além de Δ^7 -esteróides (Hegnauer, 1989). Recentemente, foi descrita a presença de proteínas e polipeptídeos biologicamente ativos, além de C-glicoflavonóides (Ling *et al.*, 1993; NG *et al.*, 1993a, 1993b; Gao *et al.*, 1994; Hamato *et al.*, 1995, Santos *et al.*, 1996).

Um trabalho de revisão apresentado por Miró (1995) cita inúmeras espécies desta família, apresentando as cucurbitacinas isoladas destas, bem como dados farmacológicos descritos na literatura para estas substâncias.

Dentre as diferentes plantas medicinais pertencentes a esta família, empregadas popularmente no Sul do Brasil, encontram-se as raízes de taiuiá. Esta droga vegetal foi descrita na 1ª edição da farmacopéia brasileira (1926) como proveniente da espécie *Cayaponia tayuya* (Vell) Cogn. No entanto, na literatura especializada do século passado e início deste, diversas espécies, principalmente dos gêneros *Cayaponia* e *Wilbrandia*, são denominadas popularmente taiuiá. Em estudos realizados com diversas espécies destes gêneros foi constatado que a espécie *W. ebracteata* é a mais freqüentemente utilizada na elaboração de fitoterápicos comercializados como taiuiá no Sul do Brasil (Farias e Schenkel, 1997; Santos *et al.*, 1996)

1.1.2. *WILBRANDIA EBRACTEATA* COGN.

Esta é uma planta da América do Sul, conhecida popularmente no Brasil como “taiuiá”, na realidade, o nome nativo de muitas espécies desta família. As raízes são indicadas na medicina popular para o tratamento da sífilis, leprose, dermatites, amenorréia, úlceras gástricas, reumatismo agudo e crônico, como antiinflamatório, entre outros (Peckolt, 1937; Pio Corrêa, 1926 - 1978).

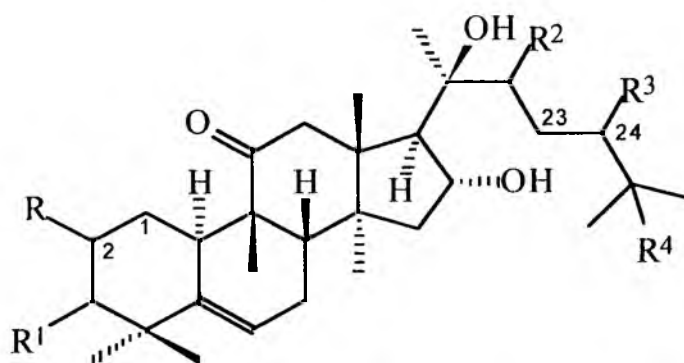
Estudos farmacológicos realizados com espécies de *Wilbrandia* ou, mais especificamente, com *W. ebracteata*, praticamente não existem. Estudos realizados por Pereira *et al.* (1996) mostraram que o extrato bruto e frações de *W. ebracteata* não apresentaram efeito mutagênico nas condições experimentais testadas. As raízes de *Wilbrandia* sp. demonstraram um efeito antitumoral em ratos com carcinoma Walker 256 e também ação citotóxica para células KB *in vitro* (Almeida *et al.*, 1991). Estudos realizados com *Wilbrandia* cf. *verticillata* mostraram um efeito inibidor da fertilidade em ratas e uma potente inibição da artrite causada por formaldeído na articulação de ratos, bem como uma inibição dose-dependente na formação de lesão granulomatosa induzida pelo óleo de cróton (Matos *et al.*, 1991; Almeida *et al.*, 1991; Teixeira *et al.*, 1994).

Estudos fitoquímicos das raízes de *W. ebracteata* levaram ao isolamento de várias cucurbitacinas, tais como, diidrocurbitacinas B e E, diidroisocucurbitacina B, cucurbitacinas B, D, E, G, H, P e a 22 – desoxicucurbitacina D, além de 4 novas cucurbitacinas apresentadas na figura 1 (Schenkel *et al.*, 1992; Farias *et al.*, 1993).

Cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos polidroxilados, geralmente de sabor amargo, encontradas tanto na forma de agliconas, quanto de heterosídeos (Lavie e Glotter, 1971). Os estudos existentes sobre cucurbitacinas demonstram

tratar-se de compostos com diferentes atividades farmacológicas; contudo, os dados são pouco conclusivos a respeito do mecanismo de ação. A investigação sistemática sobre as possíveis atividades farmacológicas desta classe de compostos poderia contribuir para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos ou, ainda, como ferramentas farmacológicas para o estudo do mecanismo de ação de outros fármacos.

Os dados apresentados até então indicam a potencialidade de *W. ebracteata* como fonte de substâncias biologicamente ativas. As cucurbitacinas isoladas desta espécie apresentam grande variabilidade estrutural, mas a maioria ainda não foi estudada do ponto de vista farmacológico.

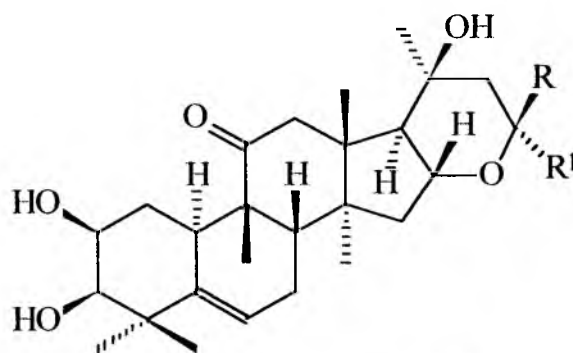


	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	outros
Cucurbitacinas com carbonila α,β-insaturada na cadeia lateral						
Cucurbitacina B	←OH	==O	==O	—H	—OCOCH ₃	$\Delta^{23,24}$
Isocucurbitacina B	==O	····OH	==O	—H	—OCOCH ₃	$\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina D	←OH	==O	==O	—H	—OH	$\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina E	—OH	==O	==O	—H	—OCOCH ₃	$\Delta^{23,24}$ $\Delta^{1,2}$
Cucurbitacinas com cadeia lateral saturada e carbonila em C-22						
Dihidrocucurbitacina B	←OH	==O	==O	—H	—OCOCH ₃	
Dihidrocucurbitacina B - 2- β -D-glicosídeo	←OGlu	==O	==O	—H	—OCOCH ₃	
Dihidroisocucurbitacina B	==O	····OH	==O	—H	—OCOCH ₃	
Dihidroisocucurbitacina B - 2- β -D-glicosídeo	==O	····OGlu	==O	—H	—OCOCH ₃	
Dihidrocucurbitacina E	—OH	==O	==O	—H	—OCOCH ₃	$\Delta^{1,2}$
Dihidrocucurbitacina E - 2- β -D-glicosídeo	—OGlu	==O	==O	—H	—OCOCH ₃	$\Delta^{1,2}$
Cucurbitacina P	←OH	←OH	==O	—H	—OH	
Cucurbitacina R	←OH	==O	==O	—H	—OH	
Cucurbitacinas com cadeia lateral saturada, carbonila em C-22 e hidroxila em C-24						
Cucurbitacina G/H	←OH	==O	==O	····OH	—OH	
Cucurbitacina J/K	—OH	==O	==O	····OH	—OH	$\Delta^{1,2}$
	==O	←OH	==O	····OH	—OH	

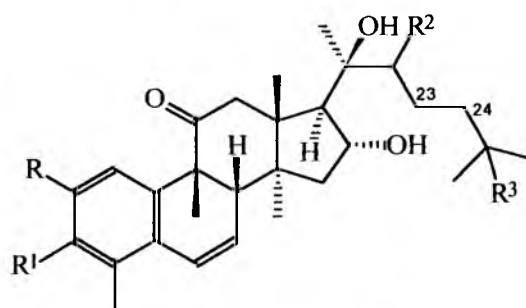
Figura 1: Estrutura das cucurbitacinas isoladas de espécies de *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (cont....)

(cont...) **Figura 1:** Estrutura das cucurbitacinas isoladas de espécies de *Wilbrandia ebracteata* Cogn.

Cucurbitacina com cadeia lateral insaturada e hidroxilas em C-22 e C-24						
	$\leftarrow\text{OH}$	$=\text{O}$	$\sim\text{OH}$	$-\text{H}$	$-\text{OH}$	$\Delta^{23,24}$
Cucurbitacinas com cadeia lateral insaturada, ausência de carbonila em C-22 e presença de hidroxila em C-24						
22-deoxocucurbitacina D	$\leftarrow\text{OH}$	$=\text{O}$	$-\text{H}$	$-\text{H}$	$-\text{OH}$	$\Delta^{23,24}$
	$\leftarrow\text{OH}$	$\leftarrow\text{OH}$	$-\text{H}$	$-\text{H}$	$-\text{OH}$	$\Delta^{23,24}$
Cucurbitacina com cadeia lateral saturada, ausência de carbonila em C-22 e presença de hidroxila em C-24						
22-deoxocucurbitacina L	$-\text{OH}$	$=\text{O}$	$-\text{H}$	$-\text{H}$	$-\text{OH}$	$\Delta^{1,2}$



R	R ¹
cucurbitacinas com anel adicional na cadeia lateral	
=C	$-\text{H}$
$-\text{H}$	=C



R	R ¹	R ²	R ³	outros
cucurbitacinas com estrutura aromática no anel A, cadeia lateral saturada				
$-\text{OGlu}$	$-\text{OH}$	$=\text{O}$	$-\text{OCOCH}_3$	

1.1.3. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE ALGUMAS CUCURBITACINAS.

As espécies da família Cucurbitaceae bem como as cucurbitacinas possuem propriedades biológicas e farmacológicas de grande interesse. Algumas cucurbitacinas atuam como inibidoras do crescimento vegetal, antigiberilina (Guha e Sen, 1973) e têm ação atrativa de insetos (Sharma e Hall, 1971a; 1971b). Uma revisão sobre os efeitos biológicos das cucurbitacinas foi apresentada recentemente por Miró (1995).

Várias espécies da família das Cucurbitaceae têm sido utilizadas na medicina popular por suas propriedades laxativas decorrentes da ação das cucurbitacinas (Le Men *et al.*, 1969; Yesilada *et al.*, 1988; Bruneton, 1993). No estômago, as cucurbitacinas estimulam secreções gástricas, devido ao seu forte sabor amargo e isto tem estimulado o uso de algumas espécies como estomáquicas (eupépticas): *Momordica charantia* e *Momordica balsamina* (Okabe *et al.*, 1982; Falope *et al.*, 1990).

O fruto verde de espécie *Cucumis melo* (melão) contém cucurbitacinas B e E e é indicada pela medicina tradicional chinesa para tratar hepatite (Hu *et al.*, 1982). A cucurbitacina B mostrou-se efetiva no tratamento da hepatite crônica, normalizando os níveis de proteínas hepáticas no plasma de animais (Han *et al.*, 1979).

Almeida *et al.* (1991) observaram que o ciclo estral de camundongos foi alterado após o tratamento dos animais com a fração purificada de *Wilbrandia* sp., a qual possui duas cucurbitacinas contendo estruturas aromáticas no anel A, sugerindo um possível efeito inibitório da ovulação. Os mesmos autores demonstraram também que a administração da fração purificada em ratas de 1 a 7

dias de gravidez provocou uma ausência total ou uma redução do número de nidações.

Algumas cucurbitacinas presentes em *Momordica charantia* (melão-de-são-caetano) apresentam atividade antibacteriana (Falope *et al.*, 1990). Outras são fungicidas, como as cucurbitacinas I e D isoladas *Ecballium elaterium* que inibiram a formação do ARNm (ácido ribonucléico mensageiro) que expressa a enzima laccase em culturas de *Botrytis cinera*, o que poderia ser interpretado como efeito fungicida (Bar-Nun e Mayer, 1989; Gonen *et al.*, 1996).

A ação anti-helmíntica da abóbora, cujas sementes são usadas contra *Taenia* em crianças, é atribuída à presença de cucurbitacinas. Albert *et al* (1970) testaram diferentes cucurbitacinas em ratos infestados com *Syphacia obvelata* e *Hymenolepis nana* var. *fraterna*, obtendo-se resultados interessantes com as cucurbitacinas L e E e com alguns derivados semi-sintéticos.

Bean *et al.* (1985) verificaram que a cucurbitacina B, a iso-cucurbitacina B, e espécies de plantas nas quais elas são encontradas, demonstraram potente ação citotóxica quando testadas em culturas de células KB provenientes de carcinomas nasofaríngeos humanos. A atividade citotóxica destes compostos, bem como a possível ação antitumoral, foram investigadas em vários modelos experimentais (para revisão ver Miró, 1995).

Outras espécies, tais como *Ecballium elaterium* (ecbálio), *Bryonia alba* (briônia) e *Cayaponia tayuya* (taiuiá) são utilizadas na medicina popular como antiinflamatórias e são também aplicadas topicamente para curar problemas de sinusite e reumatismo (Bauer e Wagner, 1983, Yesilada *et al.*, 1989). Yesilada *et al.* (1988) demonstraram uma atividade antiinflamatória dose-dependente para o extrato de *Ecballium elaterium*. Estes mesmos autores observaram uma redução da

permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético e a cucurbitacina B, isolada deste extrato, também demonstrou uma ação antiinflamatória significativa. Outro fato interessante é que a ação antiinflamatória da cucurbitacina B poderia estar relacionada com a síntese dos eicosanóides, uma vez que esta modificou a síntese de leucotrieno B₄. Rios *et al.* (1990) demonstraram que a fração apolar de *Cayaponia tayuya* (taiuiá), composta principalmente de cucurbitacinas, exibiu potente atividade antiinflamatória, no entanto, com alta toxicidade oral e parenteral; a fração flavonoídica (polar) foi menos tóxica mas menos ativa. Estudos realizados por Almeida *et al.* (1991) mostraram que a principal fração das raízes de *Wilbrandia* sp, contendo cucurbitacinas, produziu, na dose de 200 mg/kg, uma inibição significativa do edema de pata produzido pela carragenina e da lesão granulomatosa.

1.1.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um mecanismo de defesa do corpo envolvendo uma série de eventos que podem ser iniciados por numerosos estímulos, entre eles, agentes infecciosos, isquemia, interação antígeno-anticorpo, lesão física ou térmica. Cada tipo de estímulo desenvolve uma característica particular de resposta dependendo do agente lesivo, das características do tecido ou do órgão afetado e da existência de estados patológicos (Rocha e Silva, 1978; Scott *et al.*, 1994). Macroscopicamente, a reação inflamatória é acompanhada de sinais cardinais tais como: eritema, hiperalgesia (brandura) e dor.

A resposta inflamatória ocorre em três fases distintas, cada uma aparentemente mediada por diferentes mecanismos: a **fase aguda transitória**, caracterizada por vasodilatação local e aumento na permeabilidade capilar; a **fase tardia subaguda**, é caracterizada pela infiltração de leucócitos e células fagocíticas e a **fase crônica proliferativa**, em que ocorre fibrose, degeneração tecidual e disfunção do órgão.

A vasodilatação que ocorre na **fase aguda transitória** se deve à ação dos mediadores sobre as arteríolas e vênulas. É reconhecido que nesta fase são liberados inúmeros mediadores, entre os quais podemos citar as cininas, histamina (Hist), serotonina (5-HT), fator de ativação plaquetária (PAF), proteínas do sistema complemento, produtos da via do ácido araquidônico (AA), como os leucotrienos (LT), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). Além disto, algumas substâncias são liberadas localmente pelas terminações nervosas como as taquicininas, o peptídeo relacionado ao gen da

calcitonina (CGRP) e o peptídeo vasoativo intestinal (VIP) (Hua, 1986; Haanen e Vermes, 1995; Ichikawa *et al.*, 1996).

Na **fase tardia subaguda** ocorre a quimiotaxia, processo pelo qual as células migram para o sítio inflamatório. Os fatores quimiotáticos ocorrem tanto na corrente sangüínea quanto no sítio da lesão. Para este evento destacam-se o sistema complemento e as cininas, importantes fatores quimiotáticos de origem plasmática (Burch e DeHaas, 1990; Abbas *et al.*, 1991; Davies *et al.*, 1994). Esta mobilização adequada dos leucócitos circulantes é fundamental para a defesa do organismo, devido a sua capacidade fagocítica e de destruição do agente nocivo. Outros eventos como a degranulação local de mastócitos e a indução da agregação plaquetária podem resultar na liberação de mediadores que são quimiotáticos para os macrófagos e os monócitos (Sibille e Reynolds, 1990). Entre os mediadores considerados quimiotáticos estão a PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, prostaciclina (PGI_2), ácido 5-hidroperoxido-eicosatetraenóico (5 – HETE), cininas, fibrino-peptídeos, peptídeos liberados por neutrófilos e o leucotrieno B_4 (LTB_4), entre outros (Fontone, 1985; Beutler e Cerami, 1986, Haanen e Vermes, 1995). Paralelamente ocorre a marginalização leucocitária, processo pelo qual os leucócitos passam a ser detectados nas proximidades da parede do vaso, uma vez que estes normalmente circulam no centro da luz do vaso. Além disto, a migração celular é facilitada pela expressão de moléculas de adesão em diferentes tipos de células (Bevilacqua, 1993).

As células que migram ou que são ativadas para o sítio do processo inflamatório são, portanto, responsáveis pela geração e manutenção dos mediadores inflamatórios. Assim sendo, a mobilização de leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) para o sítio inflamatório resulta na ativação

destas células que, por sua vez, passam a sintetizar e liberar um grande número de agentes tipo produtos da via do AA e citocinas, entre outros (Wolfe e Horrocks, 1994).

Os neutrófilos são ativamente fagocíticos e a destruição de microorganismos está intimamente associada ao processo de degranulação, onde ocorre a liberação de grânulos do fagossoma dessas células (Cramer, 1992). Outras células ativadas neste processo são os eosinófilos. Estas células, quando ativadas, liberam mediadores lipídicos bioativos, derivados do AA, proteína catiônica e básica principal, peroxidase, entre outros.

Na **fase crônica proliferativa** ocorre a perda da funcionalidade do órgão, que normalmente é um efeito secundário da resposta inflamatória tecidual e da dor. A dor associada nesta reação se deve à estimulação de fibras sensoriais nociceptivas locais por mediadores químicos tais como a bradicinina e a histamina (Dray e Bevan, 1993). A transdução da dor envolve interações de mediadores com os receptores de membrana que são acoplados a canais iônicos e ou sistema de segundo mensageiro, resultando na mudança da excitabilidade da membrana celular. A resposta dolorosa induzida por estes mediadores é potencializada por produtos da via do AA (PGE_2 , PGI_2 , PGD_2) e por aminas simpatomiméticas, possivelmente a dopamina liberada localmente. A produção de hiperalgesia também deve ser vista como um importante mecanismo que contribui para a regeneração e reparo tecidual (Andy *et al.*, 1994). Além disto, outros mediadores são liberados no sítio inflamatório, entre eles estão as citocinas, como por exemplo, as interleucinas (IL) do tipo IL-1, IL-6 e IL-8, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon (IFN). Estes mediadores, exceto a IL-8, medeiam a resposta febril através da indução da síntese de PGE_2 em áreas específicas do hipotálamo (Dinarello *et al.*, 1988, 1991).

Assim como os mediadores inflamatórios derivados da via do AA, atualmente é reconhecida a participação do óxido nítrico (NO) no processo inflamatório (Salvemini *et al.*, 1993). Um mecanismo pelo qual o NO pode exercer seu efeito inflamatório, é através do aumento da produção de prostaglandinas (Salvemini *et al.*, 1993; Davidge *et al.*, 1995).

Como descrito anteriormente diversos estímulos, sejam eles exógenos ou endógenos, desencadeiam uma reação inflamatória onde são liberadas substâncias químicas que amplificam este processo. Na tabela 1 está relacionada a maioria dos mediadores da inflamação.

Tabela 1. Mediadores envolvidos no processo inflamatório

<i>Sistema mediador</i>	Fontes (localização)	Ações
Radicais derivados do Oxigênio ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , HO^{\cdot})	Leucócitos e células endoteliais	Dano tecidual através de citólise, ativação do complemento e geração de lipídios quimiotáticos.
Constituintes dos grânulos lisossomais (proteases, lisozimas, lactoferrina, proteínas catiônicas)	Neutrófilos, monócitos	Dano tecidual através de proteólise e catálise das reações gerando oxidantes.
Citocinas e TNF	Monócitos, macrófagos	Quimiotaxia, ativação celular, febre, resposta da fase aguda.
Complemento	Plasma	Quimiotaxia, extravasamento vascular, ativação celular
Cininas (Bradicinas, calcitreína)	Plasma	Dor, extravasamento vascular
Coagulação	Plasma	Extravasamento vascular
Aminas vasoativas (Hist, 5-HT)	Plaquetas, mastócitos e basófilos	Extravasamento vascular
PAF	Leucócitos, células endoteliais	Extravasamento vascular, ativação celular.
NO	Plaquetas, células endoteliais	Vasodilatação
Prostaglandinas (PGs)	Membrana celular	Coagulação, vasodilatação, regulação da produção de mediadores
Produtos da lipoxigenase: (5 – HETE), leucotrienos (LT): LTB₄, LTD₄, LTE₄.	Leucócitos	Extravasamento vascular, ativação celular, quimiotaxia.

Assim sendo, a inflamação é um processo complexo que envolve vários mediadores provenientes das células e do plasma, originando a elaboração de efeitos biológicos inter-relacionados. As prostaglandinas, produtos da via do AA, são os mediadores encontrados em todos os estágios da inflamação. Estes mediadores são produzidos em grande quantidade e participam do desenvolvimento das reações

inflamatórias, principalmente por potencializar os efeitos dos outros mediadores (Scott *et al.*, 1994; Vane, 1994).

1.1.4.1. AS PROSTAGLANDINAS

Os eicosanóides são produtos bioativos derivados da ciclooxygenação e peroxidação do ácido araquidônico, liberados das membranas de diferentes células. A primeira conversão do ácido araquidônico para prostanóides, incluindo prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI_2) e tromboxano A_2 (TXA_2), é catalisada pela enzima prostaglandina H sintase (PGHS). A PGHS é uma enzima bifuncional. Ela possui um sítio ciclooxygenase (COX), que torna cíclico o AA e adiciona o grupamento 15 – hidroperóxido para formar prostaglandina G_2 (PGG_2). Ela também contém um sítio peroxidase que reduz o grupamento hidroperóxido para um grupamento hidroxila formando prostaglandina H_2 (PGH_2). A figura 2 demonstra que a PGH_2 é convertida em uma das várias prostaglandinas. Este produto possui diversos papéis fisiológicos ou patológicos (Pairet e Engelhardt, 1996).

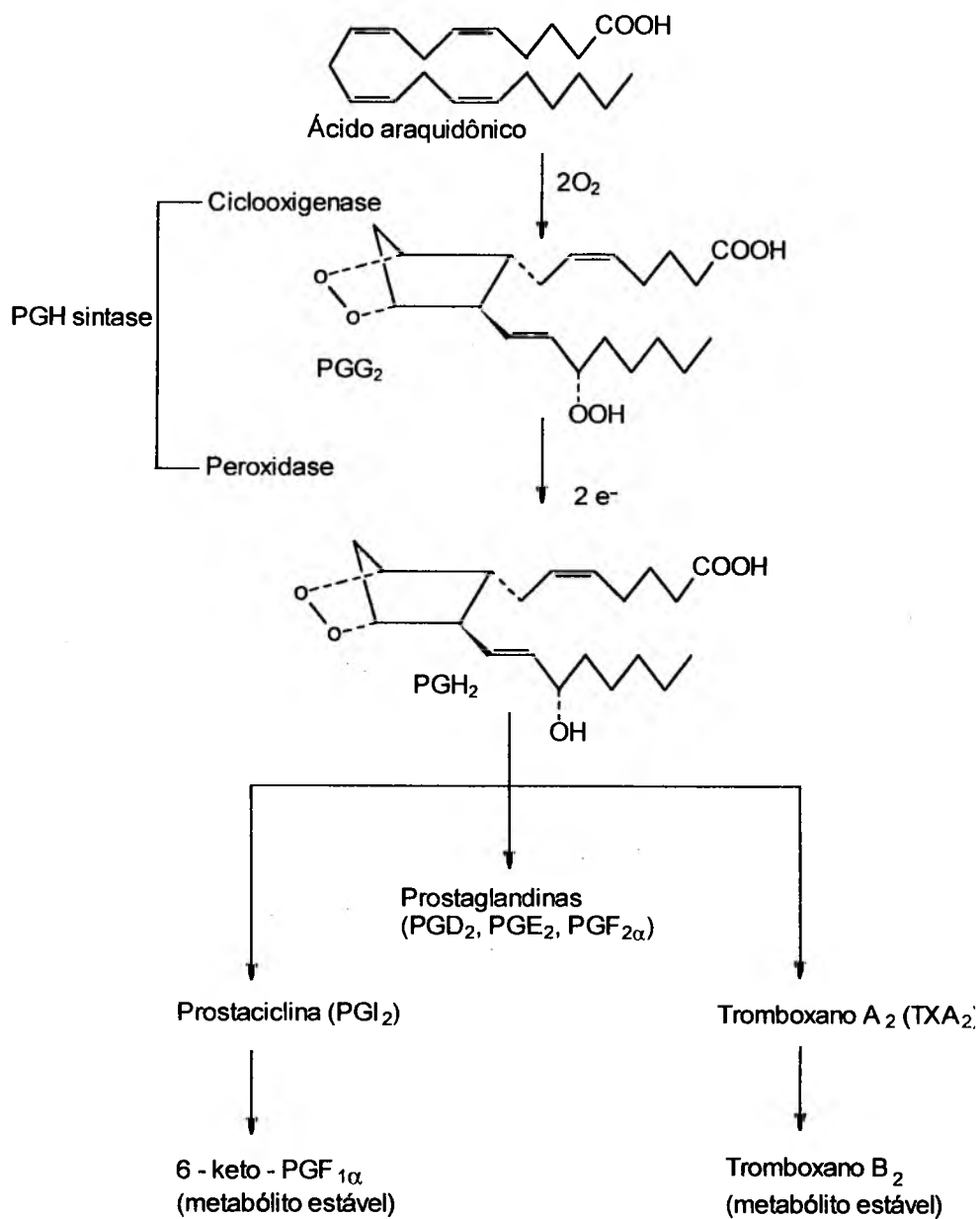


Figura 2. Conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos (Pairet e Engelhardt, 1996)

As prostaglandinas, principalmente PGE₂, têm sido largamente conhecidas como mediadores da inflamação (Ferreira, 1972; Zurier, 1993; Pairet e Engelhardt, 1996). Contudo, elas participam na modulação de muitos processos fisiológicos, assim como a regulação da temperatura corporal (Milton, 1989), neurotransmissão (Okia *et al.*, 1990) e sono (Hayashi, 1989). As prostaglandinas controlam a função renal por várias vias (Stokes, 1981; Bonvalet *et al.*, 1987; Sonnenburg *et al.*, 1990). A PGI₂ aumenta o fluxo sangüíneo e a taxa de filtração glomerular. A PGE₂ inibe o transporte de cloretos através da alça de Henle e bloqueia os efeitos do hormônio antidiurético (ADH) no túbulo coletor, reduzindo a absorção de água. Além disto, PGI₂ e PGE₂ estimulam a secreção de renina pelo rim, levando à liberação de aldosterona que, por sua vez, promove a reabsorção de sódio com conseqüente excreção de potássio no túbulo contorcido distal e coletor.

Uma variedade de prostanóides (PGE₂, PGI₂) que são produzidos durante a inflamação são conhecidos por excitar os nociceptores, ou mais usualmente, sensibilizando-os para outros estímulos, contribuindo para a hiperalgesia periférica (Dray *et al.*, 1994).

Na Figura 3 estão representadas as atividades citoprotetoras das prostaglandinas no estômago. As prostaglandinas por inibirem a atividade da adenilato ciclase (AC) estimulada pela histamina, diminuem a secreção ácida pelas células parietais. As prostaglandinas também estimulam a secreção de muco e bicarbonato pelas células epiteliais superficiais adjacentes (Reeves *et al.*, 1988).

Adicionalmente, a PGI₂ liberada do endotélio inibe a agregação plaquetária e é considerada um potente vasodilatador. Em contraste, o TXA₂ é um potente agregante plaquetário e vasoconstritor, produzido pelas plaquetas e outras células em resposta a uma estímulo ou injúria vascular (Bhagwat *et al.*, 1985).

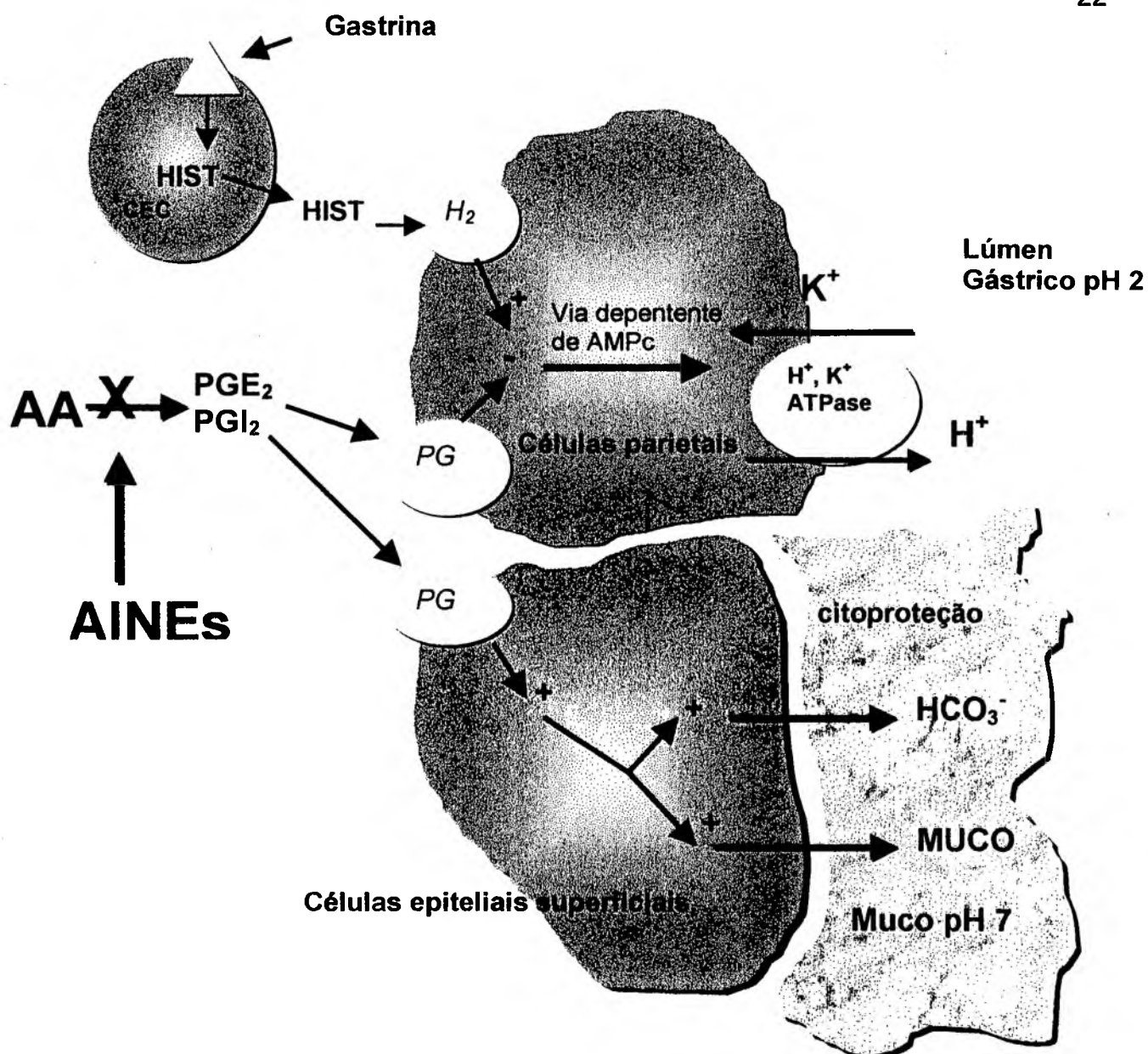


Figura 3. Regulação da secreção gástrica pelas prostaglandinas. Este esquema mostra que a histamina liberada pelas células enterocromafins (CEC). A histamina liga-se com o receptor de histamina (H₂) promovendo a liberação de ácido (H⁺). As PGE₂, através dos receptores de PG, nas células parietais inibem (-) a liberação de ácido. Nas células epiteliais superficiais a PGI₂ estimula (+) a liberação de muco e bicarbonato (HCO₃⁻). Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) inibem a produção de prostaglandinas. A marca vermelha (X) indica um ponto de antagonismo farmacológico.

Desta maneira, a classificação das prostaglandinas como mediadores da inflamação é, portanto, incompleta. As prostaglandinas exercem seus efeitos na célula de origem ou em estruturas vizinhas, assim, são melhor descritas como autacóides ou hormônios locais (Maciel *et al.*, 1995).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), assim como a aspirina, têm sido usados por muitos anos no tratamento de doenças inflamatórias e, ao longo deste tempo, vêm demonstrando inúmeros efeitos colaterais. Estes efeitos incluem toxicidade gastrointestinal, como mostra a figura 3 (Bollini *et al.*, 1992; Scheiman, 1992), mudanças das funções renais (Wen *et al.*, 1992; Perneger *et al.*, 1995), reações alérgicas (rashes), eventos no sistema nervoso central e infiltração pulmonária com eosinofilia (Goodwin e Glenny, 1992), entre outros.

Atualmente é bem aceito que o efeito sistemático da inibição de prostaglandinas pelos AINEs, bem como a inibição da síntese de PGE₂ gastrointestinal, levam a um aumento na secreção gástrica e a uma diminuição do muco protetor das células superficiais da mucosa, como apresentado na figura 3 (Simon, 1993). Quanto ao mecanismo de ação dos AINEs, tanto os efeitos terapêuticos (antiinflamatório) quanto os colaterais, são provavelmente devidos à mesma ação bioquímica como, por exemplo, a inibição da ciclooxigenase. A dissociação entre os efeitos desejáveis e indesejáveis destas drogas são praticamente impossíveis. Recentes avanços do estudo farmacológico das prostaglandinas podem, no entanto, levar à identificação de novos alvos para o tratamento das doenças inflamatórias e degenerativas. Uma vez que as prostaglandinas ajudam a manter a proteção gástrica, o estudo da regulação de sua produção pode ser importante para o desenvolvimento de formas de terapia mais aceitáveis.

Recentes estudos têm mostrado a existência de duas isoformas de COX (Rosen *et al.*, 1989; Hla e Nielson, 1992). A primeira é descrita como prostaglandina H sintase - 1 (PGHS -1) ou ciclooxigenase-1(COX-1). Sob determinadas condições fisiológicas, a COX-1 está predominantemente ativa e atua como uma enzima "housekeeping", na maioria dos tecidos, incluindo a mucosa gástrica, os rins e as plaquetas. Além disto, a COX -1 é expressa constitutivamente e está distribuída em todos os tecidos (O'Banion *et al.*, 1991; 1992a). A isoenzima recentemente descoberta é chamada de prostaglandina H sintase - 2 (PGHS-2) ou ciclooxigenase - 2 (COX-2). Ela está usualmente ausente ou presente em pequenas quantidades em células não-proliferativas, mas sua expressão pode ser aumentada por mitógenos e condições que estimulam a proliferação celular (Herchman, 1992; Raisz *et al.*, 1993), bem como por estímulos químicos como éster de forbol (Kujubu *et al.*, 1991), prostaglandinas (Takarashi *et al.*, 1994), cálcio ionóforo (Ristamaki *et al.*, 1994) e diferentes citocinas (Ristamaki *et al.*, 1994; O'Banion *et al.*, 1992a). Por outro lado a expressão de COX-2 pode ser inibida por glicocorticóides (Masferrer *et al.*, 1990; O'Banion *et al.*, 1991; O'Banion *et al.*, 1992a e 1992b; Herchman *et al.*, 1992).

As enzimas COX-1 e COX-2 possuem aproximadamente 60% de homologia, no entanto, ambas possuem valores similares de K_m e V_{max} para a metabolização do ácido araquidônico (Meade *et al.*, 1993). Como descrito anteriormente, as enzimas COX-1 e COX-2 são expressas sob condições fisiológicas em tecidos de ratos (Feng *et al.*, 1993) e humanos (O'Neill e Ford-Hutchinson, 1993). No entanto, a expressão de COX-2 pode ser aumentada mais de 20 vezes durante processos inflamatórios (Hla *et al.*, 1993; Masferrer *et al.*, 1994; Vane *et al.*, 1994; Cavanaugh *et al.*, 1995; Harada *et al.*, 1995), já a atividade da COX-1 permanece inalterada ou aumenta

marginalmente de 2 a 3 vezes. As diferenças na expressão das isoenzimas PGHS sugere que a COX-1 e a COX-2 exercem seus efeitos em diferentes eventos fisiológicos. Como está representado na figura 4, a COX-1 encontra-se predominantemente no retículo endoplasmático, já a COX-2 encontra-se duas vezes mais concentrada no envelope nuclear do que no retículo endoplasmático (Morita *et al.*, 1995; Otto e Smith, 1995).

A COX-1 e a COX-2 são inibidas diferentemente pelos AINEs (Smith e DeWitt, 1994; Vane e Botting, 1995) e a natureza da inibição tempo-dependência das duas isoformas varia com os AINEs (Ouellet e Percival, 1995). Na tabela 2 é apresentada uma comparação entre COX-1 e COX-2, quanto às suas estruturas genéticas, funções, propriedades físico-químicas e distribuição tecidual.

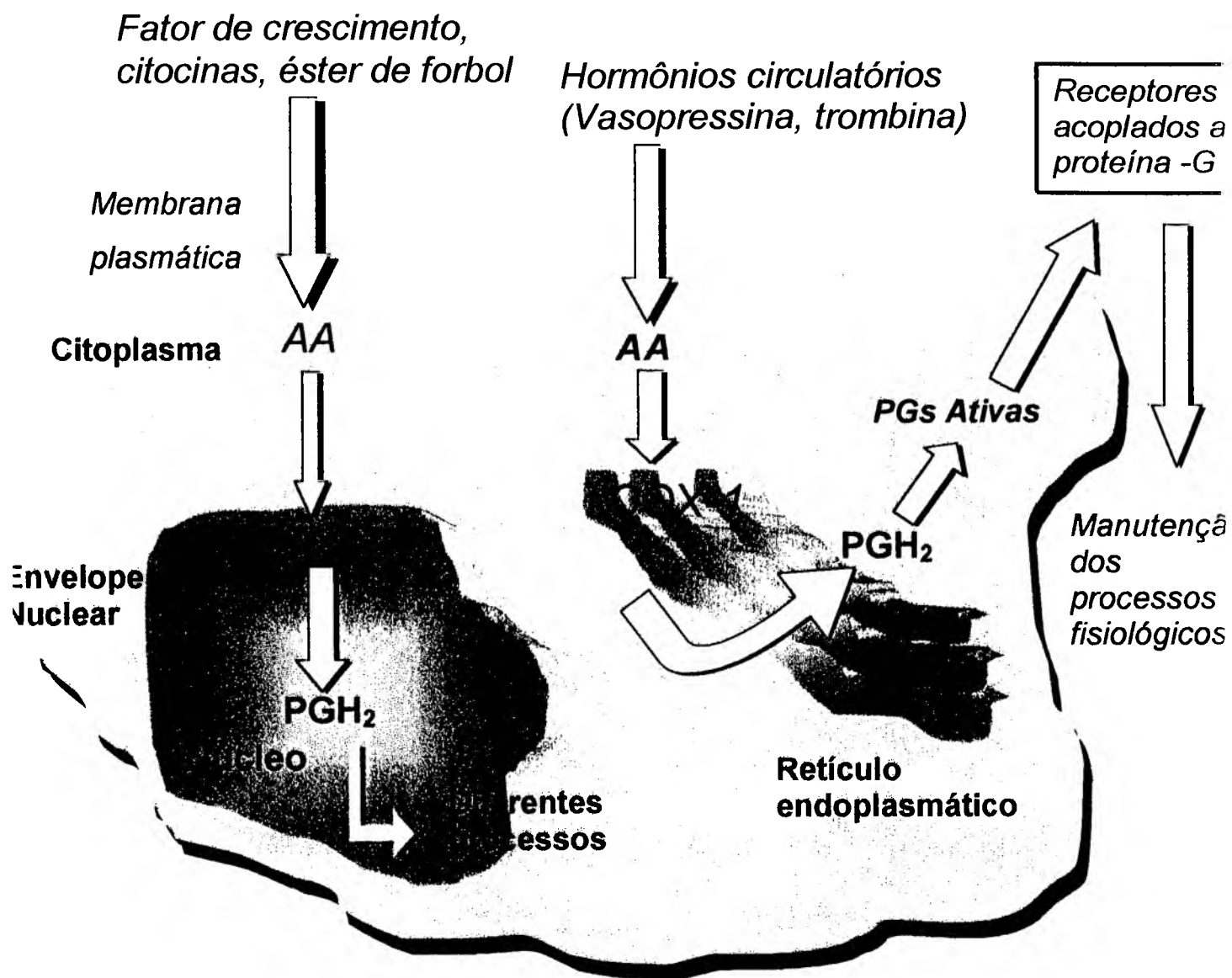


Figura 4. Proposta de vias separadas para a biossíntese de prostaglandinas através das enzimas COX-1 e COX-2. O ácido araquidônico (AA) é mobilizado em resposta aos hormônios circulatórios para a manutenção dos processos fisiológicos (COX-1) ou através de agentes mitógenos para respostas diferenciadas (COX-2). O AA mobilizado em resposta aos agentes mitógenos é canalizado diretamente para COX-2, e PGH₂ é liberada no núcleo.

Tabela 2. Comparação entre COX-1 e COX-2

	COX-1	COX-2
ADNc	Cromossomos 2 ou 9 22 kb	Cromossomo 1 8,3 kB
ARNm	72kDa 600 – 602 aminoácidos estrutura conhecida	72 kDa 603 – 604 aminoácidos
HOMOLOGIA	<p>Aminoácidos: 90% entre as espécies para ambas as enzimas</p> <p>COX-1 e COX-2: aproximadamente 60% de identidade, 75% similar</p> <p>Valores de V_{max} e R_m similares para ácido araquidônico</p>	
Regulação	Constitutível: expressão ativada durante o desenvolvimento/diferenciação celular	Induzível: expressão ativada de 10 a 80 vezes através de fatores de crescimento, citocinas e éster de forbol Constitutível no SNC
Efeito dos glicocorticóides	Pequeno ou nenhum efeito sobre a expressão	Inibe a expressão nas células ativadas.
Expressão tecidual	Encontrada na maioria dos tecidos: vesícula seminal, plaquetas, células endoteliais, rins, estômago.	Altamente induzida por estímulos inflamatórios em: macrófagos/monócitos, sinoviócitos, condrócitos, fibroblastos, células endoteliais. Induzida por hormônios nos ovários e na membrana de células fetais.
Papel fisiológico das isoenzimas	Isoenzima "housekeeping": produz prostaglandina para a manutenção das funções fisiológicas, assim como a função do rins e estômago e homeostase vascular	Isoenzima "differentiative": produz prostaglandina para processos inflamatórios, ovulação e mitogêneses

O fato de que a enzima COX-1 é expressa em pequena quantidade e de forma constante, e que a expressão de COX-2 é aumentada por citocinas inflamatórias e proliferação celular, sendo inibida pelos corticosteróides, sugere que COX-1 é uma enzima constitutiva. Assim a COX-1 é responsável pela síntese basal de prostaglandina, participando nos processos fisiológicos e a COX-2 é responsável pela produção de prostaglandinas em situações patológicas. Esta teoria tem sido reforçada pela demonstração de que COX-2 é a isoenzima mais importante na membrana sinovial reumatóide de humanos (Crofford *et al.*, 1994), no modelo da bolsa de ar em ratos (Masferrer *et al.*, 1994), no edema de pata e pleurisia induzidos pela carragenina em ratos (Seibert *et al.*, 1994; Harada *et al.*, 1996). Sendo assim, o desenvolvimento de inibidores específicos da COX-2 oferece o prospecto para uma nova geração de AINEs mais seletivos, com menos efeitos colaterais atribuídos à inibição da enzima constitutiva, COX-1. Neste contexto, a inibição seletiva da COX-2 poderia proporcionar uma ação antiinflamatória tão potente quanto a dos corticosteróides sem os efeitos colaterais típicos destes hormônios e dos AINEs disponíveis. Têm sido descritos alguns compostos com atividade inibitória preferencial sobre COX-2 em relação a COX-1 (Figura 5). Esta ação tem sido efetivamente sugerida para o composto NS-398, um inibidor seletivo da COX-2, com ação antiinflamatória no modelo da bolsa de ar em ratos, e que, ao contrário dos outros AINEs, não é ulcerogênico (Futaki *et al.*, 1994; Masferrer *et al.*, 1994). No entanto, o desenvolvimento de alguns deste compostos tem sido descontinuado, uma vez que não são provadas nos ensaios *in vivo* a tolerância gastrintestinal e renal.

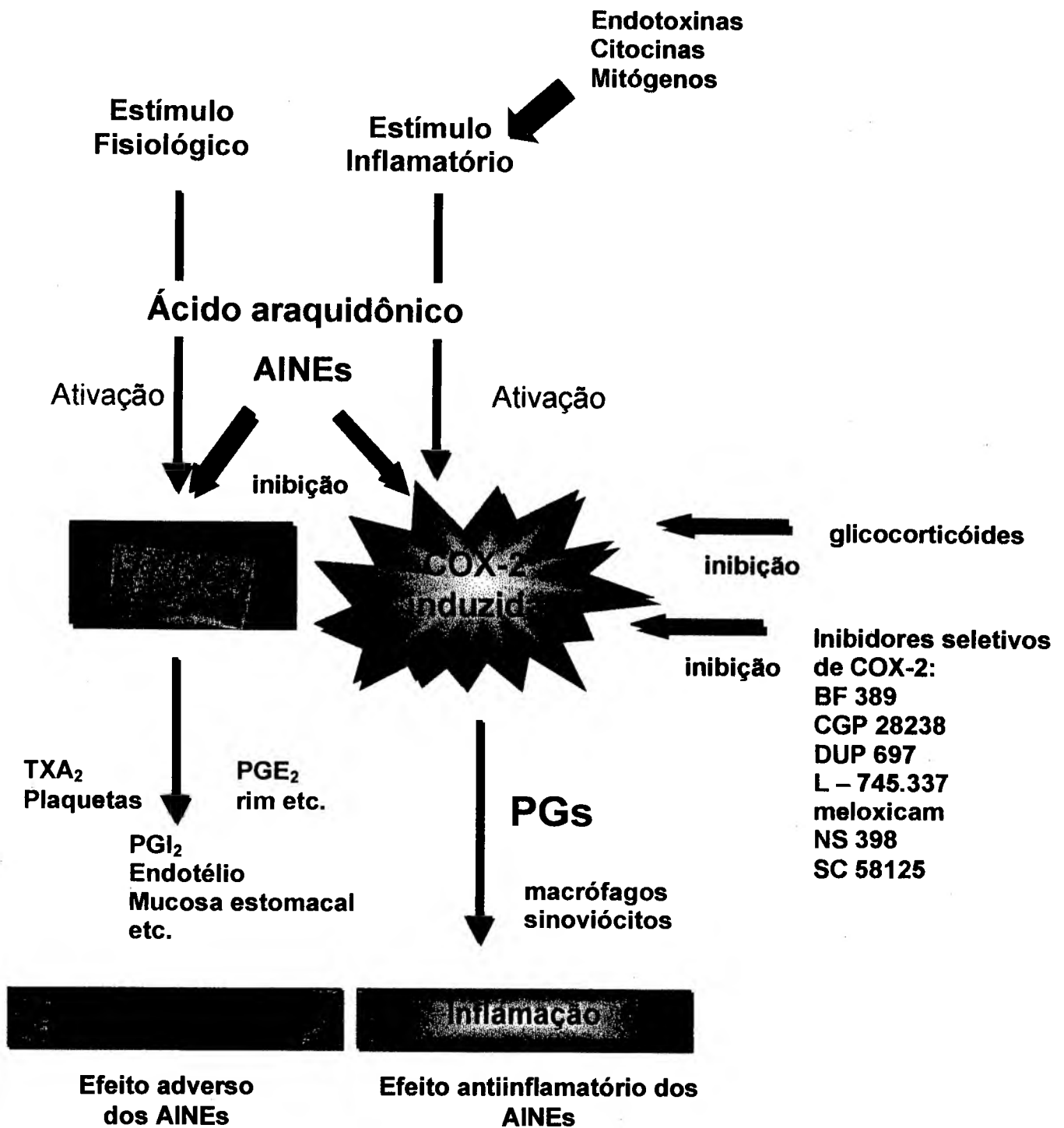


Figura 5. Inibidores de COX-1 e COX-2.

2. OBJETIVOS

O presente estudo procurou avaliar os efeitos analgésico e antiinflamatório dos produtos de *W. ebracteata* em diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* com os seguintes objetivos específicos:

1. Investigar as possíveis ações antinociceptivas do extrato bruto metanólico de *W. ebracteata* e de suas frações no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.
2. Avaliar se a atividade antinociceptiva da fração, que mostrou ser mais efetiva no teste de contorções abdominais, está envolvida com a dor de origem neurogênica ou inflamatória, através dos testes da dor induzida pela formalina ou através do teste do *tail-flick* que avalia dor neurogênica.
3. Avaliar o efeito da fração que apresentou maior atividade antinociceptiva, bem como de suas frações purificadas e de seus compostos isolados no teste do edema de pata induzido pela carragenina.
4. Avaliar a atividade antiinflamatória da fração, de suas frações purificadas e de seus compostos isolados, que apresentaram atividade antiedematogênica, na pleurisia induzida pela carragenina, onde os parâmetros analisados serão a migração celular, o extravasamento plasmático e a produção de prostaglandina E₂ na cavidade pleural de camundongos.
5. Avaliar o efeito da fração que apresentou atividade antiinflamatória sobre a mucosa gástrica.
6. Analisar se os efeitos antiinflamatórios observados *in vivo* resultam da inibição da atividade da enzima humana COX-2 *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para os experimentos de toxicidade aguda, dose letal (DL₅₀) e farmacológicos foram utilizados camundongos suíço, machos, com idade entre 1,5 a 3 meses, pesando em média 20 - 30g e ratos *Wistar* machos com idade entre 1,5 a 2 meses pesando em média 150 - 220g.

Todos os animais foram provenientes do Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia (CCB, UFSC) e, alojados em gaiolas plásticas, mantidos em temperatura ambiente controlada (22 ± 2 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial e água *ad libitum*.

3.2. MATERIAL BOTÂNICO

Foram utilizadas raízes de *W. ebracteata* (Figura 6) coletadas em Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brasil, em dezembro de 1987. A planta foi identificada pelo Professor Sérgio Bordignon (Departamento de Botânica da Universidade de Pelotas, RS, Brasil). Amostras da espécie estão depositadas no Herbário da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.



Figura 6. Folhas e raízes de *W. ebracteata* Cogn.

3.3. FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE *W. ebracteata*.

Os procedimentos de fracionamento e isolamento de princípios ativos de *W. ebracteata*, foram executados pela Prof. Dra. Mareni Rocha Farias, do departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade federal de Santa Catarina. As raízes de *W. ebracteata* foram secas em estufa (45°C/5 dias) e moídas. Inicialmente foram desengorduradas através de maceração com éter de petróleo. Posteriormente, as raízes foram maceradas com metanol (5 l / 30 dias). O extrato metanólico foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo suspenso em H₂O. Esta suspensão foi sucessivamente extraída com solventes de polaridade crescente: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. O extrato bruto metanólico e as frações diclorometano (F - CH₂Cl₂), acetato de etila (F - AcOEt) e n - butanol (F - n - BuOH), bem como a fração aquosa residual (F - H₂O) foram investigadas no presente trabalho. A F - CH₂Cl₂ (28 g) foi cromatografada em coluna MPLC em sílica gel 60 (10 x 50 cm), por gradiente de eluição com éter de petróleo/acetato de etila (AcOEt) 1:3,5 (8 l), éter de petróleo/AcOEt/i-PrOH 1:3,5:3,5 (3,6 l) e depois AcOEt/i-PrOH 1:1 (2,5 l), 20 ml/min. Conforme o esquema da figura 7 foram, então coletadas dez frações purificadas (FP): I (2.350 ml), II (1.200 ml), III (1.500 ml), IV (1.500 ml), V (650ml), VI (900 ml), VII (1.200 ml), VIII (2.400 ml), IX (1.000 ml), X (2.500 ml). A fração III foi recromatografada em sílica gel G (2,5 x 80 cm), hexano/acetona 1:1, 2,5 ml/min da qual foram isoladas, na forma pura, cucurbitacina E (5 mg), cucurbitacina B (50 mg) e diidrocucurbitacina B (40 mg) com estruturas químicas demonstradas na figura 8. Os compostos foram identificados através dos seus dados físicos e espectroscópicos (Farias *et al.*, 1993)

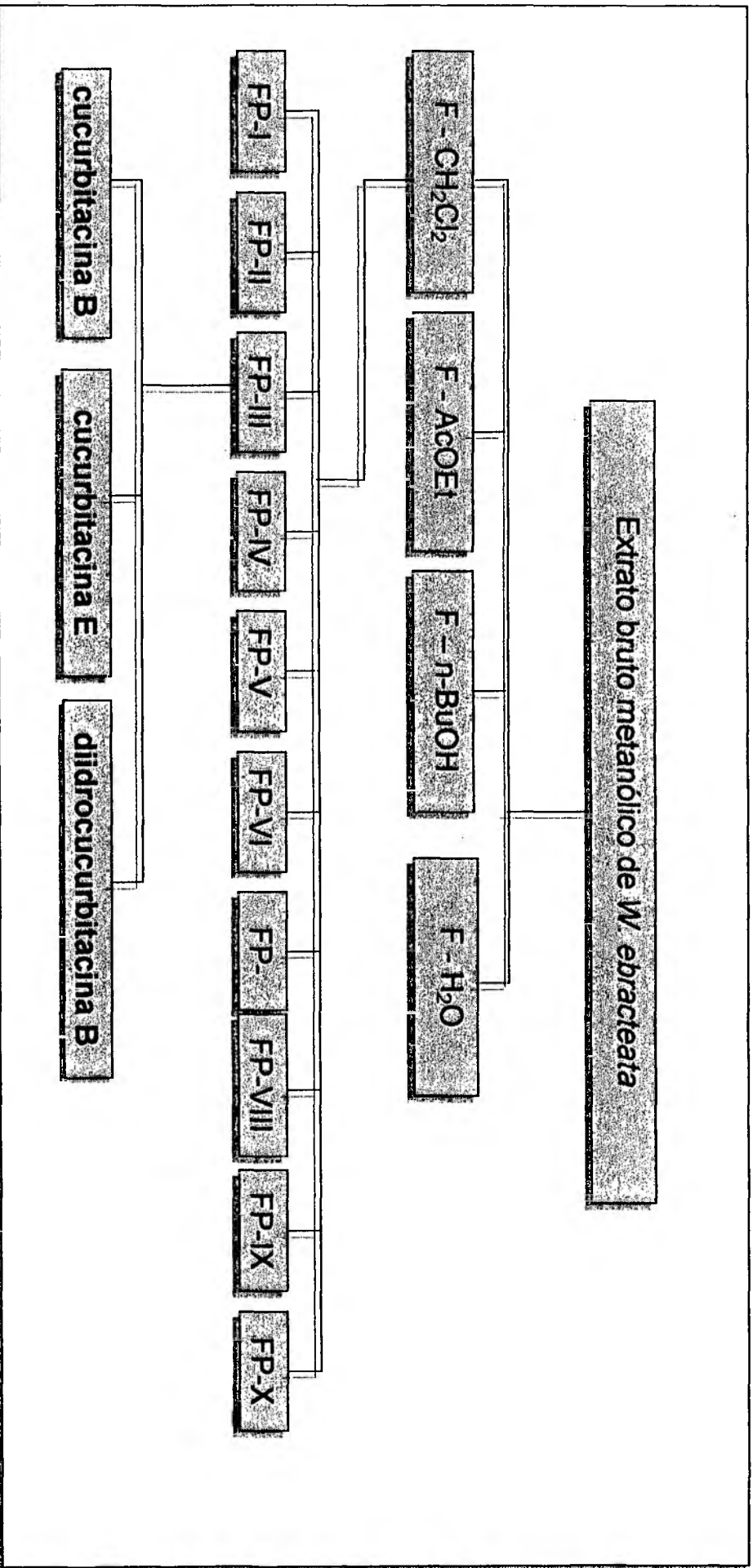


Figura 7. Representação do esquema de fracionamento e isolamento das frações, frações purificadas e dos compostos de *W. ebracteata*.

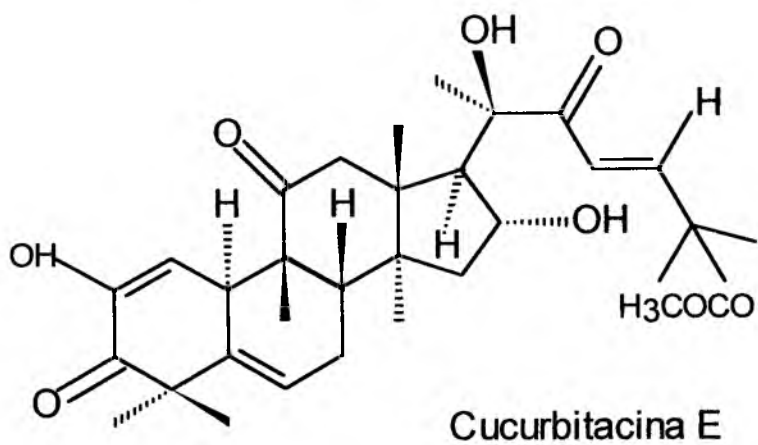
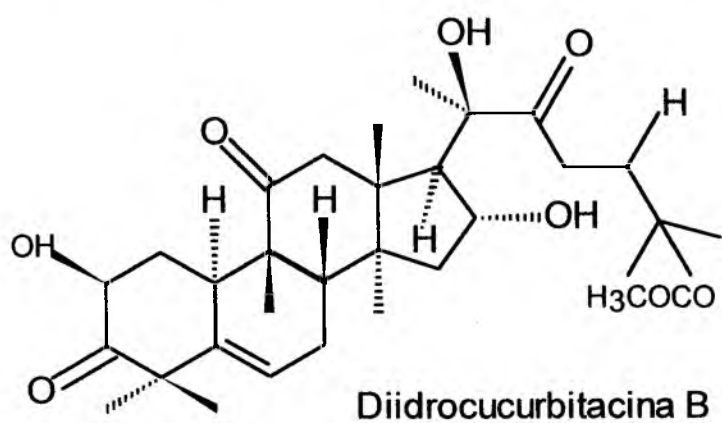
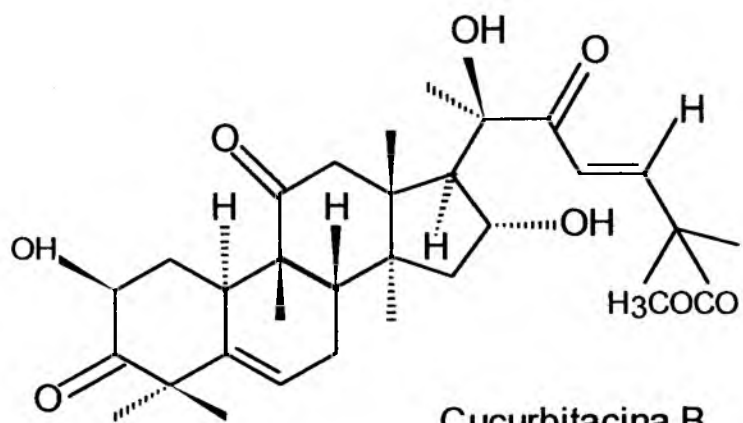


Figura 8. Estrutura química da cucurbitacina B, diidrocucurbitacina B e cucurbitacina E.

3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS "IN VIVO".

3.4.1. ATIVIDADE GERAL - TOXICIDADE AGUDA E DL₅₀ EM CAMUNDONGOS

Este ensaio foi realizado de acordo com o método proposto por Carlini (1972) e Malone (1977, 1983). A observação comportamental geral foi realizada simultaneamente à determinação da DL₅₀. Vinte e quatro horas anteriores ao início do experimento, os animais foram retirados do Biotério Setorial e colocados na sala de experimentos *in vivo* para ambientação. Os camundongos foram privados de ração e água, 6 h antes do início dos experimentos, tendo acesso à alimentação e água após o tempo de observação de 120 minutos (min). Grupos de camundongos machos foram tratados pelas vias intraperitoneal (i.p.) ou oral (v.o.) com o veículo (0,1 ml de DMSO 1%/ 10 g de peso corporal), considerados grupo controle, ou com diferentes doses da F-CH₂Cl₂ (3, 10, 20 e 30 mg/kg, i.p.) ou (10, 30, 50 e 100 mg/kg v.o.). Os camundongos foram observados em grupos de cinco, em gaiolas de vidro medindo 26 x 14 x 19 cm, com fundo de tela de arame, aos 0, 15, 30, 45, 60, 120 min e às 18 e 24 horas após a administração da F – CH₂Cl₂. Todas as gaiolas de observação foram mantidas em sala com temperatura controlada (22 - 23⁰C) em ciclo claro/escuro. Os parâmetros comportamentais observados, para cada intervalo de tempo, foram os seguintes: contorções abdominais, pêlos arrepiados, ptose, movimentação, hipotermia, tônus muscular, tremores, paralisia, secreções, convulsões e morte.

3.4.2. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

3.4.2.1. TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.

Para investigar o possível efeito analgésico do extrato bruto metanólico e de suas frações utilizou-se o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Apesar deste teste ser um modelo de nocicepção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Assim foi empregada a metodologia descrita anteriormente (Koster *et al.*, 1959; Colier *et al.*, 1968).

Os diferentes grupos experimentais de camundongos machos (25 – 30 g) foram tratados por via i.p. com o veículo (0,1 ml / 10 g, grupo controle), com extrato bruto metanólico (1 – 30 mg/kg), com as diferentes frações: F - CH₂Cl₂ (1 - 10 mg/kg); F - AcOEt (3 – 100 mg/kg); F - n-BuOH (30 mg/kg); F – H₂O (100 mg/kg) ou ainda com ácido acetilsalicílico (AAS, 100 mg/kg), como grupo controle positivo. Após 30 min de tratamento, os animais foram injetados por via i.p. com ácido acético diluído em salina (0,6%; 0,2 ml/10g). As contorções abdominais foram consideradas como contrações da parede abdominal seguidas por extensão de pelos menos uma das patas posteriores (Vacher *et al.*, 1964) e foram contadas acumulativamente por 20 min em camundongos colocados individualmente sob funis de vidro.

Para determinar o tempo de duração da atividade antinociceptiva produzida pela fração mais potente (F - CH₂Cl₂; 10 mg/kg, i.p.), grupos de animais foram pré -

tratados nos tempos 30, 60, 120 e 240 min antes da injeção do ácido acético. Em todos os casos, os resultados foram expressos como as médias dos números de contorções abdominais acumuladas durante 20 min de avaliação experimental.

3.4.2.2. TESTE DA FORMALINA EM CAMUNDONGOS.

Para avaliar o efeito antinociceptivo da F - CH₂Cl₂ foi utilizado o teste da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, um modelo experimental mais específico que o teste de contorções abdominais, onde pode-se avaliar duas fases distintas de dor induzida pela formalina: a primeira, observada nos 5 primeiros min após a injeção da formalina, considerada dor de origem neurogênica; a segunda, que ocorre entre 15 e 30 min após a injeção do agente nociceptivo. Esta última fase representa a resposta tônica à dor acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios (Hunskaar e Hole, 1987).

Neste experimento foram utilizados camundongos machos (25 – 35 g) tratados por via i.p. ou v.o. com o veículo (0,1ml/10g, grupo controle) ou com a F-CH₂Cl₂ (1 - 10 mg/kg, i.p) ou (3 - 30 mg/kg, v.o.). Os animais do grupo controle positivo, foram tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.). Após 30 min dos tratamentos por via i.p. ou 60 min por v.o., os animais foram injetados com 20µl de formalina 2,5% (formaldeído 0,92% em solução tampão fosfato: PBS) na região intraplantar da pata posterior direita e colocados individualmente sob funis de vidro localizados à frente de um espelho (20 x 50 cm) para facilitar a observação. Em seguida foi observada a reatividade, considerada como o tempo gasto em segundos

pelos animais lambendo ou mordendo a pata injetada, durante as duas fases da dor: a primeira, quando decorridos de 0 a 5 min; e a segunda fase, quando decorridos de 15 a 30 min da avaliação experimental (Hunnskaar *et al.*, 1985; Murray *et al.*, 1988). Os resultados foram expressos como as médias \pm E. P. M. dos tempos de reatividade dos animais, cronometrados em segundos, durante as duas fases de dor avaliadas.

No final do tempo de observação os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e suas patas posteriores foram cortadas na articulação tibio-tarsal e pesadas. A diferença entre o peso (em mg) das patas posteriores foi considerada como índice de edema.

3.4.2.3. TESTE DO TAIL-FLICK EM CAMUNDONGOS.

A atividade analgésica da F - CH₂Cl₂ foi a seguir avaliada no teste do *tail-flick*, um modelo de dor muito sensível para investigar drogas que atuam no sistema nervoso central, como a morfina e seus derivados. Para este teste foi empregada a metodologia descrita por D'Amour e Smith (1941) utilizando-se 6 camundongos por grupo experimental, previamente selecionados quanto as suas reatividades ao estímulo térmico nociceptivo, sendo desprezados aqueles animais cujas leituras foram superiores a 8 segundos. O ensaio consistiu em medir a reatividade dos animais ao estímulo térmico nociceptivo induzido por um foco de luz (90 W) convergente na cauda, utilizando-se um analgesímetro (modelo: *Tail-flick Analgesia*

Meter - ALBARSCH). A reatividade dos animais ao estímulo térmico foi avaliada a cada 15 min até 45 min após o tratamento dos animais por via i.p. com o veículo (0,1 ml / 10g, grupo controle), F - CH₂Cl₂ (10 mg/kg) ou por via subcutânea (s.c.) com morfina (10 mg/kg), como grupo controle positivo. Os resultados foram expressos como as médias dos tempos de reação ao estímulo nociceptivo em segundos, nos diferentes tempos de avaliação experimental.

3.4.3. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

3.4.3.1. TESTE DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM RATOS

A carragenina desencadeia um processo inflamatório agudo com diferentes fases onde ocorre a liberação de diferentes mediadores envolvidos na inflamação, tais como as aminas biogênicas (Hist e 5-HT), cininas e eicosanóides (Di Rosa *et al.*, 1971). O edema de pata induzido pela carragenina é um modelo muito utilizado para avaliar a ação de drogas com possível atividade antiinflamatória, isto porque o processo inflamatório induzido na pata é sensível à ação inibitória de drogas antiinflamatórias não - esteroideais e esteroideais.

Para este experimento foram utilizados ratos machos (180 – 200 g) tratados por via i.p. ou v.o. com o veículo (0,1 ml/100g, grupo controle), com a F - CH₂Cl₂ (1 - 10mg/kg, i.p ou 3 - 30 mg/kg, v.o.) ou com as frações purificadas por via i.p. nas doses de 3 mg/kg (FP – I a III) e de 10 mg/kg (FP – IV a X). Outros grupos experimentais foram tratados com os compostos isolados por via i.p., que foram

cucurbitacina B (1 mg/kg), diidrocurbitacina B (1 mg/kg) ou cucurbitacina E (1mg/kg). Os animais do grupo controle positivo foram tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.). Após 30 min de tratamento por via i.p. ou 60 min por v.o., os animais foram injetados na região intraplantar da pata posterior direita com 0,1 ml de carragenina (300 μ g/pata) e na pata posterior contralateral com o mesmo volume de PBS (0,1 ml).

Arquimedes, cientista e matemático grego (287 – 212 a.C.), postulou o seguinte princípio: todo o corpo total ou parcialmente imerso em um fluido recebe deste um empuxo vertical dirigido para cima, de módulo igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo (Resnick e Halliday, 1985).

Levando em consideração o Princípio de Arquimedes o volume da pata foi determinado através do aumento do peso promovido pela imersão da pata até a articulação tíbio-társica num becker (capacidade de 80 ml) contendo lauril sulfato de sódio, colocado sobre uma balança eletrônica (Marte) tarada (Larsen e Arnt, 1985). As variações do volume das patas foram registradas numericamente pela balança nos tempos zero (antes da injeção do agente flogístico) e após 30, 60, 120 e 240 min. Os resultados foram expressos como as médias \pm E.P.M. das diferenças de volume das patas posteriores injetadas com carragenina e das patas posteriores contralaterais injetadas com salina (Leme *et al.*, 1973). As percentagens de inibição para cada grupo tratado em relação ao controle foram calculadas através da área sob a curva.

3.4.3.2. TESTE DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM RATOS ADRENALECTOMIZADOS

Para avaliar a possível interferência dos glicocorticóides endógenos no efeito antiinflamatório da F - CH₂Cl₂ os animais foram adrenalectomizados. Diferentes grupos de animais foram anestesiados com tribromoetanol (2,5%) e adrenalectomizados bilateralmente através de incisão no dorso. Os animais controle (falso operados) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, sem no entanto serem removidas as adrenais. Após as cirurgias, os animais adrenalectomizados (ADL) receberam *ad libitum* NaCl (0,9%; v.o.) a fim de serem evitados os efeitos da ausência dos mineralocorticóides, e os falsos-operados (FO), água de torneira. Decorrida uma semana do procedimento cirúrgico, os animais ADL e FO foram tratados pela via i.p. com o veículo (0,1 ml/100g) ou F - CH₂Cl₂ (10 mg/kg i.p.). Após 30 min, carragenina (300 µg/pata) foi administrada na região intraplantar da pata posterior e a pata contralateral com o mesmo volume de salina (0,1 ml). Procedeu-se, então de acordo com o protocolo do item 3.4.3.1.

3.4.3.3. TESTE DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

A pleurisia é um modelo utilizado para a caracterização e "screening" de novas drogas com atividade antiinflamatória (De Brito, 1989). Neste modelo experimental é possível avaliar, simultaneamente, o número total e diferencial de

células, bem como o extravasamento plasmático (Lo *et al.*, 1982), além da concentração de mediadores inflamatórios (Capasso *et al.*, 1975) na cavidade pleural.

Para este experimento foram utilizados camundongos machos (18 – 25 g) tratados por via i.p. ou v.o. com o veículo (0,1 ml/10g) considerado grupo controle ou com a F - CH₂Cl₂ (0,01 a 10 mg/kg, i.p.) ou (3 a 30 mg/kg, v.o.). Outros grupos experimentais foram tratados com a FP – III (3,0 mg/kg, i.p.) ou com cucurbitacina E (1,0 mg/kg, i.p.). Para controle positivo, grupos de animais foram tratados com indometacina (5 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.). Após 30 min para os tratamento por via i.p. e 60 min para v.o., foi induzido a pleurisia com a injeção de carragenina 1% (1mg/cavidade) no espaço pleural direito dos camundongos. Os animais foram sacrificados quatro horas após à aplicação da carragenina com uma overdose de éter. A seguir, abriu-se o tórax, expondo-se a cavidade pleural, a qual foi lavada com 1 ml de PBS (pH 7,4; heparinizado: heparina 20 IU/ml) sendo o volume coletado com pipeta automática (Saleh *et al.*, 1996).

A contagem dos leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer por meio de um microscópio óptico comum após diluição do líquido pleural em solução de Türk (1:200). Para a contagem do diferencial celular, as células foram coradas com May-Greenwald-Giemsa e contadas através de microscópio óptico comum sob objetiva de imersão.

Para avaliar o grau de extravasamento plasmático no espaço pleural, diferentes grupos de animais foram injetados com uma solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml, i.v.), 2 horas antes dos experimentos. Uma amostra do fluido

coletado (500 μ L) do espaço pleural foi separada e estocada em freezer (-20°C) para posterior determinação da concentração do corante azul de Evans. A quantidade do corante foi então determinada através de colorimetria (Compu-Espectro Spectrometer, Brasil) a 600 nm por interpolação de uma curva padrão construída ao azul de Evans na faixa de 0,01 – 50 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.3.4. DOSAGEM DOS NÍVEIS DE PGE_2 NO EXSUDATO INDUZIDO PELA CARRAGENINA NA CAVIDADE PLEURAL DE CAMUNDONGOS

Para quantificar os níveis de prostaglandina E_2 no exsudato pleural, diferentes grupos de animais foram tratados por via i.p. ou v.o. com o veículo (0,1 ml/10g, grupo controle), com F - CH_2Cl_2 (0,001 - 10 mg/kg, i.p.) ou (0,03 a 10 mg/kg, v.o.). Outros grupos experimentais foram tratados com cucurbitacina B (0,1 mg/kg) ou como grupo controle positivo com indometacina (10,0 mg/kg, i.p.) ou aspirina (100 mg/kg, i.p.). Após 30 min para os tratamento por via i.p. e 60 min para v.o. foi injetada a carragenina, procedendo-se como descrito anteriormente no item 3.4.3.3. à exceção que os animais não receberam previamente azul de Evans. Os exsudatos foram coletados e acondicionados em tubos de polietileno. As células foram separadas do exsudato através de centrifugação (1500 rpm/5 min) e os sobrenadantes foram então congelados a -70°C até serem utilizados.

Os níveis de PGE_2 no exsudato pleural foram medidos através de radioimunoensaio (RIA). O princípio geral do RIA baseia-se em uma reação de

competição. O antígeno marcado reage com o anticorpo dando origem a um complexo marcado, numa reação em que é atingido o equilíbrio (Voet e Voet, 1995). As amostras dos exsudatos pleurais (sobrenadantes) foram descongeladas à temperatura ambiente no dia do experimento. A seguir foram acrescentadas às alíquotas de 50 μ l da amostra o mesmo volume de TRIS(pH 7,4), ficando esta mistura em repouso por 2 h sob temperatura de 4°C. Após este procedimento, acrescentou-se à mistura 50 μ l do anticorpo anti-prostaglandina E₂. Este anticorpo não discrimina a prostaglandina E₁ (PGE₁) da prostaglandina E₂ (PGE₂). Posteriormente, as amostras foram incubadas com (³H)PGE₂ (50 μ Ci/ml) por 24 horas. As frações ligadas (B) e livres (B₀) foram separadas acrescentando-se 100 μ l de uma suspensão de carvão ativado, dextrana e TRIS (pH: 7,4) na proporção de (5:1:250). Em seguida, a mistura foi centrifugada durante 10 min (4°C, 3400 rpm). O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para os recipientes apropriados, cada um contendo 4 ml do líquido de cintilação. As amostras foram colocadas no contador (Beckman, LS 6800), para medir a quantidade de radiação em cintilação por minuto (cpm). A quantidade de PGE₂ foi então estimada pela interpolação de uma curva à PGE₂ padrão na faixa de 0,5 a 20 ng/ml. A sensibilidade do RIA foi definida como 90% intercepção de uma curva padrão B/B₀ e foi julgada ser de 2 ng/ml.

3.4.3.5. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA F-CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* SOBRE A MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS.

Já está bem estabelecido que a supressão da síntese de prostaglandinas é um componente chave do mecanismo da ulceração gástrica causada pelos AINEs (Vane, 1971; Wallace e Tingley, 1995). Sob este aspecto, procurou-se avaliar os possíveis efeitos da F - CH₂Cl₂ sobre a mucosa gástrica, onde utilizou-se ratos machos Wistar (200 – 240g) mantidos em jejum por 24 horas antes do experimento. Grupos de animais foram tratados com 0,2 ml de veículo, F - CH₂Cl₂ (30 mg/kg, i.p. e v.o.), indometacina (30 mg/kg, i.p. e v.o.) ou aspirina (100 mg/kg, v.o). Após quatro horas os animais foram sacrificados com uma dose excessiva de éter e através de uma incisão abdominal, os estômagos foram retirados e abertos ao longo da pequena curvatura e lavados com salina. O número e severidade das úlceras foram observadas a olho nu, anotadas e numeradas de acordo com uma escala arbitrária de 0 a 6 pontos (Tabela 3) descrita por Magistretti et al (1988). O índice de ulceração (IU) de cada estômago foi expresso através dos pontos obtidos em cada experimento.

Tabela 3. Escala para determinação da severidade da úlcera formada.

0	=	sem lesão
1	=	1 – 3 lesões pequenas (\leq 10 mm comprimento)
2	=	1 – 3 lesões grandes ($>$ 10 mm comprimento)
3	=	1 – 3 lesões profundas
4	=	mais de 3 lesões pequenas
5	=	mais de 3 lesões grandes
6	=	mais de 3 lesões profundas

3.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS “IN VITRO”.¹

3.5.1. ESTUDOS DO EFEITO DA F - CH₂Cl₂ E FP – III de *W. ebracteata* SOBRE A ATIVIDADE DA CICLOOXIGENASE HUMANA-2 (hCOX-2).

3.5.1.1. Cultura celular

Para avaliar o efeito da F - CH₂Cl₂ e FP-III foram utilizadas células Cos-7, uma linhagem imortalizada de células renais de macaco, cultivadas em placas de Petri 100 mm (Falcon, Becton Dickinson Labware, Lincoln, Park, NJ), em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/ml), e estreptomicina (100 µg/ml) em pH 7,4, à 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Para o procedimento de transfecção, as células foram cultivadas em placas de 6 poços.

3.5.1.2. PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO

Para a transfecção transitória foi utilizado o plasmídeo hCOX-2pcDNA1, gentilmente cedido pelo Dr. Timothy Hla. Os plasmídeos foram transfectados em bactérias *E. coli* competentes e purificados em dez frações, de volumes variados. Para pequenas quantidades foi realizada uma preparação do tipo “miniprep” e para

¹ Estes protocolos experimentais foram realizados no Departamento de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Sherbrooke, Quebec, Canada, através de intercâmbio com o Prof. Dr. Artur J. de Brum Fernandes.

quantidades maiores, do tipo “maxiprep” (Maniatis *et al.*, 1982) com o Kit QIAGEN (QIAGEN Inc, Chatsworth, CA).

3.5.1.3. TRANSFEÇÃO TRANSITÓRIA.

Quando as culturas das células Cos-7 estavam confluentes (confluência máxima de 60% a 75%), foram transfectadas com hCOX-2 inserido em plasmídeos pcDNA1, usando o procedimento otimizado com o reagente LipofectAMINE™ (Gibco BRL). Este reativo (5 μ L por poço) e o plasmídeo (2 μ g por poço) foram incubados em DMEM (volume final de 200 μ L por poço), durante 45 min, em temperatura ambiente. Após, estes 200 μ L foram adicionados a uma placa de cultura, cujos poços já continham 800 μ L de DMEM, sendo incubadas por 5 horas em estufa (37°C, 5% de CO₂, atmosfera umidificada). A seguir, o meio usado foi removido e substituído por DMEM mais 10% de SFB (Figura 9).

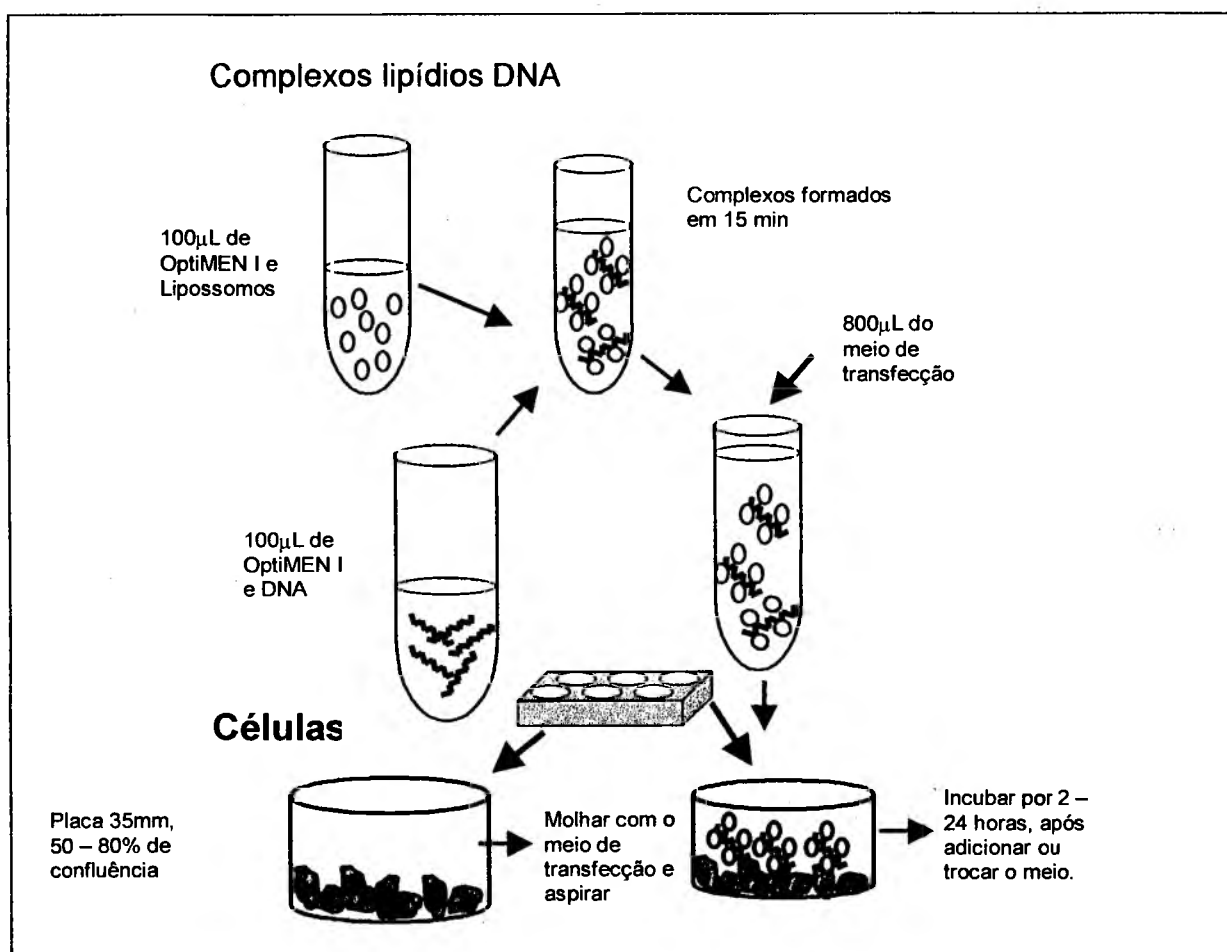


Figura 9. Representação esquemática do procedimento de transfecção transitória.

3.5.1.3. INFECÇÃO COM VIRUS VACCINIA RECOMBINANTE INSERIDO EM BACTERIÓFAGO T7 RNA POLIMERASE.

Para maximizar a expressão de hCOX-2, foram utilizadas culturas de células Cos-7 (confluência máxima de 60% a 75%) cultivadas em placas de 6 poços com DMEM mais 10% de SFB. As células foram infectadas com o vírus vaccinia recombinante inserido em bacteriófago T7 RNApolimerase. Uma hora após a infecção, as células foram lavadas com PBS-MB (Salina tampão fosfato, 1mM MgCl₂) e executou-se conforme explicado anteriormente. Este vetor viral foi escolhido por produzir a T7 polimerase em grande quantidade, o que permite aumentar a transcrição dos RNAm que contêm o *promoter* T7 relacionados com o DNA complementar da COX-2(Figura 10)

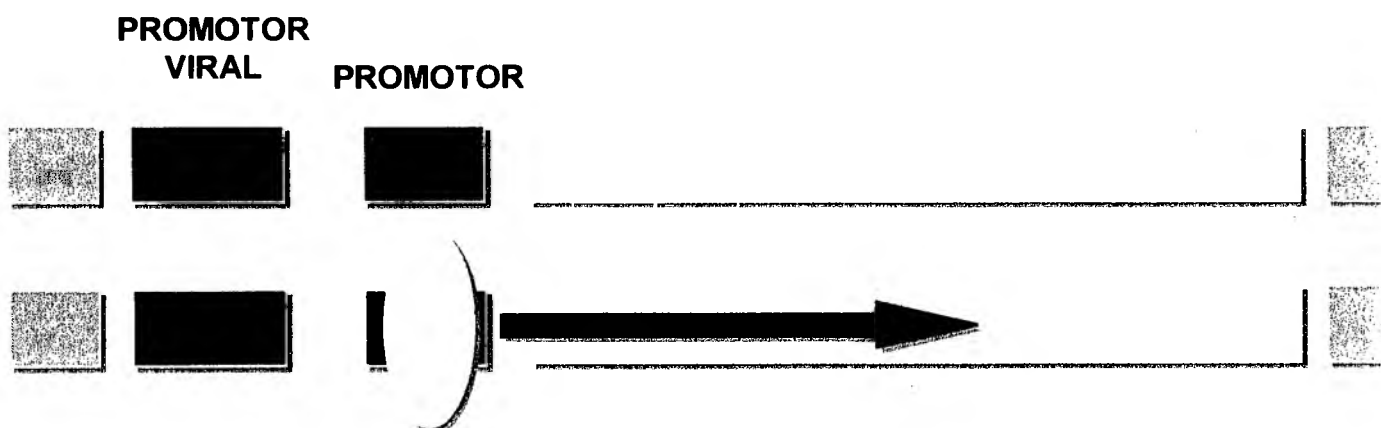


Figura 10. Representação esquemática da infecção com o vírus vaccinia recombinante inserido em bacteriófago T7 RNA polimerase.

3.5.1.4. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CICLOOXIGENASE HUMANA-2 (hCOX-2)

As células foram mantidas como descrito anteriormente. O meio foi removido e substituído por 1 ml de tampão HEPES (110 mM NaCl, 1,1 mM KH₂PO₄, 4,7 mM KCl, 5 mM D-glicose anidra, 21 mM HEPES, pH 7,4) contendo diferentes concentrações da F - CH₂Cl₂, FP-III, NS-398 ou indometacina, incubadas durante 45 min em estufa (37°C, 5% de CO₂, atmosfera umidificada). As concentrações da F-CH₂Cl₂ e da FP-III foram obtidas a partir de análise prévia das DI₅₀ estimadas nos experimentos *in vivo*. Após este procedimento, adicionou-se o ácido araquidônico (40 μM), sendo a amostra incubada por 20 min em estufa (37°C, 5% de CO₂, atmosfera umidificada). Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C. No dia dos experimentos, as amostras foram brandamente descongeladas em temperatura ambiente e a concentração de prostaglandina E₂ no sobrenadante foi determinada através da técnica de RIA, como descrito anteriormente para as amostras de exsudato pleural no item 3.4.3.4.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (EPM), exceto as DI_{50} (dose do extrato bruto metanólico e das frações que produziram 50% de inibição da resposta induzida pelo agonista, em relação ao grupo controle) que são apresentadas como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança (IC) em nível de 95%. A DL_{50} foi calculada através de regressão linear. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett e/ou Newman-Keuls quando necessário. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

3.7. DROGAS E REAGENTES

As seguintes drogas foram usadas: carragenina lâmbda (tipo IV), indometacina, AAS, dexametasona, PGE₂ padrão, anticorpo anti - PGE₂, tampão TRIS (pH: 7,4 Trisma base 100mM e Trisma HCl 100mM), dextrana, carvão ativado, DMEM, SFB, penicilina, estreptomicina, tampão HEPES, tribromoetanol (Sigma Chemical Co, EUA). [5, 6, 8, 11, 12, 14, 15 (n) – ³H]PGE₂ (Amersham Life Science Inc., Canada), Kit Qiagen (Qiagen Inc, Canada), hCOX-2pcDNA1, LipofectAMINE[®] (Gigco BRL, EUA), Heparina (Liquemine[®], Roche, Brasil), ácido acético, formaldeído, hidrocloreto de morfina (Merck, Alemanha), Azul de Evans, solução tampão fosfato (PBS – pH 7,6: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM) (Merck, Brasil) e NS-398 (Calbiochem, Canada), líquido de cintilação (Ready Safe[™], Beckman, USA).

As soluções estoque de indometacina, AAS, NS - 398, extrato bruto metanólico, frações, frações purificadas e compostos isolados foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Chemical, EUA). A formalina 2,5% (formaldeído 0,92%) foi preparada antes do uso, em PBS. No dia dos experimentos as diluições das drogas foram realizadas em salina estéril (0,9%). A concentração final de DMSO usada para os experimentos *in vivo* não ultrapassou 1 % e a usada nas culturas de célula (*in vitro*) nunca foi maior que 4 %. Todos os sais utilizados foram de alto grau de pureza (MERCK); reagentes e solução de salina esterilizada (NaCl 0.9%) foram obtidas de diferentes fontes comerciais.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS “*IN VIVO*”

4.1.1 ATIVIDADE GERAL - TOXICIDADE AGUDA E DL_{50} EM CAMUNDONGOS

Os animais tratados por via i.p. (10 mg/kg) e v.o. (30 mg/kg) com a F-CH₂Cl₂ não apresentaram alterações comportamentais nem indícios de toxicidade em comparação com o grupo controle. O tratamento do animais com a F-CH₂Cl₂ dose de 20 mg/kg (i.p.) desenvolveu o aparecimento contorções abdominais nos animais. O tratamento por v.o. com a F-CH₂Cl₂ (50 mg/kg) fez com que os animais apresentassem paralisia dos membros posteriores, contorções abdominais e diarreia. A DL_{50} por via i.p. foi de 17,7 (8,4 – 32,8) mg/kg e por v.o. 62,4 (28,4 – 96,3) mg/kg (Figura 11).

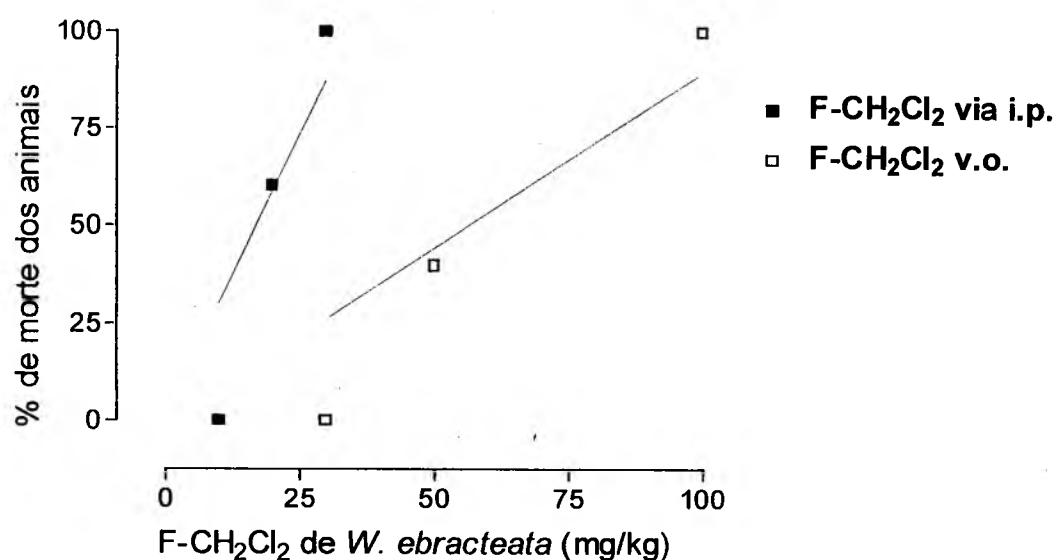


Figura 11. Regressão linear do número de morte induzidas pelo tratamento dos animais com a F - CH₂Cl₂ (10 – 30 mg/kg, ■, $r^2 = 0,92$) por via i.p. ou (30 – 100 mg/kg, □, $r^2 = 0,91$) por v.o. Cada símbolo representa a percentagem de mortes em cada grupo experimental (n = 5).

4.1.2. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.1.2.1. TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.

O número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%; 0,2ml/10g, i.p.) nos animais (controle) previamente tratados por via i.p. com o veículo (0,1ml/10g) foi de $49,0 \pm 5,2$ (contorções/20 min.). A administração prévia do extrato bruto metanólico (30 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente as contorções abdominais em 62% ($18 \pm 3,6$ contorções/20 min)($p < 0,01$) (Figura 12A e D, Tabela 5). O tratamento com a F - CH₂Cl₂ (10 mg/kg, i.p.) resultou em redução significativa das contorções abdominais em 78,0 % ($10,8 \pm 5,1$ contorções/20 min) ($p < 0,01$) (Figura 12B e D, Tabela 5). A F - AcOEt (30 mg/kg, i.p.), também reduziu significativamente as contorções abdominais em 62% ($18 \pm 8,4$ cont/20 min) ($p < 0,01$) (Figura 12C e D, Tabela 5). Os valores estimados das DI₅₀ (mg/kg) com seus respectivos IC para o extrato bruto metanólico, F-CH₂Cl₂ e F-AcOEt foram 11,35 (8,60 – 14, 99), 5,62 (3,23 – 9,93) e 16,21 (12,35 – 21,33), respectivamente. Já as F - n-BuOH e F – H₂O não reduziram significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético nas doses avaliadas (Tabela 5). O tratamento dos animais com AAS (100 mg/kg, i.p.), reduziu significativamente as contorções abdominais em 76% ($11,6 \pm 3,5$ cont/20 min)($p < 0,01$) (Tabela 5). O efeito máximo antinociceptivo da F - CH₂Cl₂ (10 mg/kg, i.p.) ocorreu 30 min após sua administração, persistindo este efeito por mais de 4 horas (Figura 13).

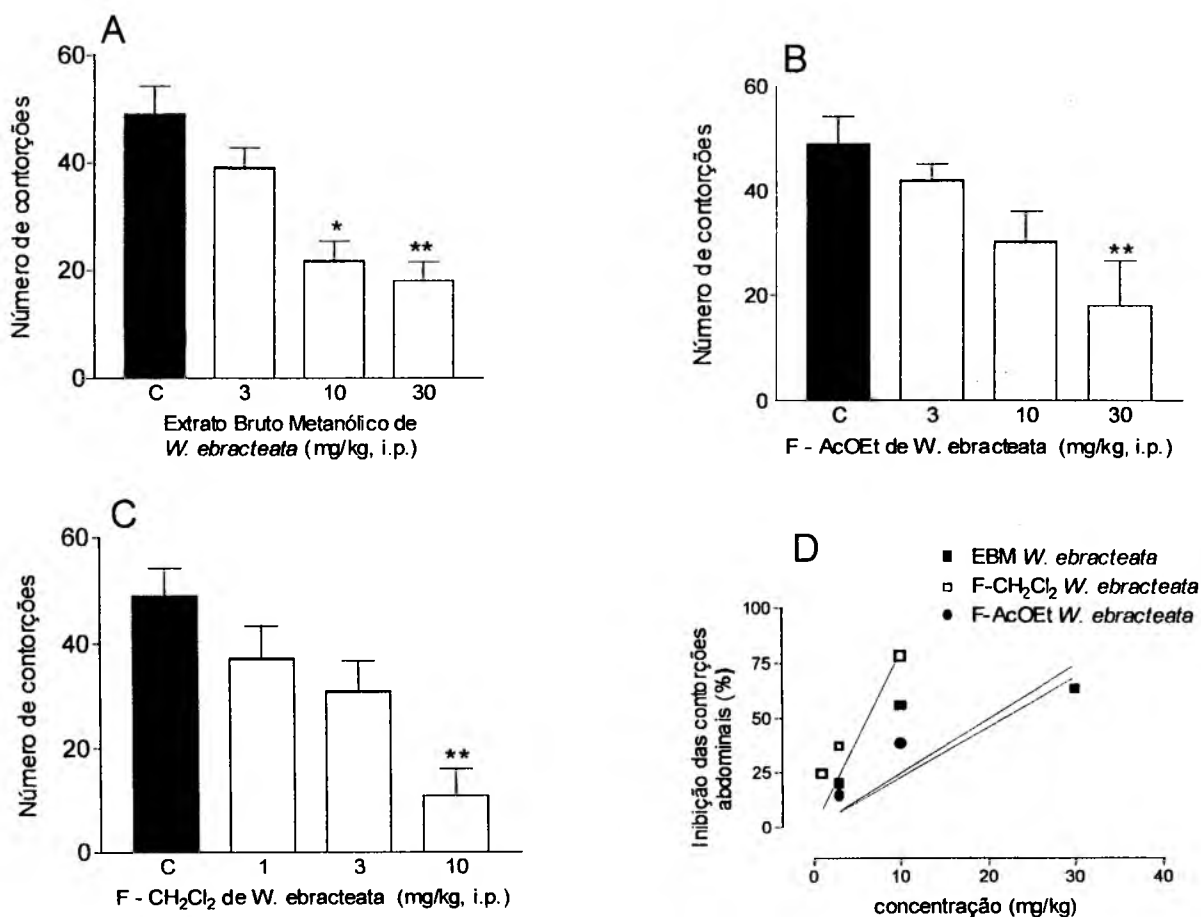


Figura 12. Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%; 0,2ml/10g, i.p.) em camundongos previamente tratados (30 min) pela via i.p. com o veículo (coluna cheia) ou extrato bruto metanólico (3 – 30 mg/kg, A), F - CH₂Cl₂ (1- 10 mg/kg, B), F - AcOEt (3 – 30 mg/kg, C) de *W. ebracteata*. As colunas e barras verticais representam as médias ± E.P.M. de 6 a 10 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), *p < 0,05 e **p < 0,01. No gráfico D está representado a regressão linear da relação dose-resposta dos diferentes tratamentos, onde os símbolos representam a média de 6 animais.

Tabela 5. Efeito do tratamento por via i.p. com o veículo, com o extrato bruto metanólico, com as frações de *W. ebracteata* ou AAS sobre o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em camundongos.

Grupos	n	Dose (mg/kg, i.p.)	Número de contorções (cont./20 min.)	Inibição das contorções (%)
Controle	10	-	49,0 ± 5,2	0
Extrato bruto metanólico	6	30	18,0 ± 3,6**	62,0 ± 7,3
F – CH ₂ Cl ₂	6	10	10,8 ± 5,1**	78,1 ± 10,4
F – AcOEt	6	30	18,0 ± 8,4**	62,2 ± 17,1
F - n – BuOH	6	30	31,7 ± 10,1	35,2 ± 20,6
F – H ₂ O	6	30	41,3 ± 5,8	16,5 ± 11,8
AAS	6	100	11,6 ± 3,5**	76,7 ± 7,1

Difere significativamente em relação ao grupo controle, **p < 0,01

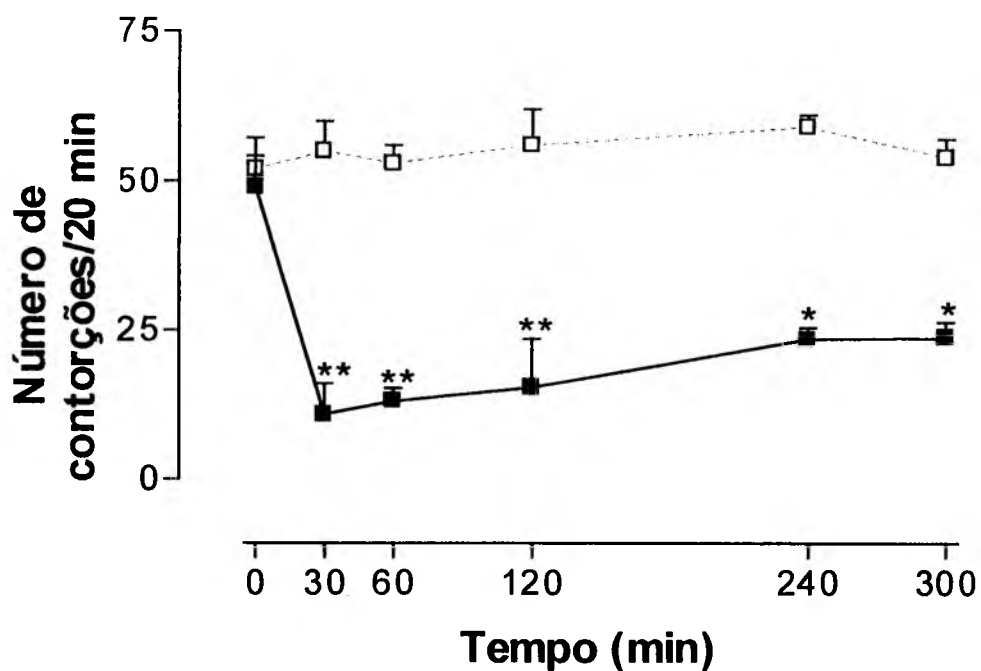


Figura 13. Perfil temporal da atividade antinociceptiva produzida pelo F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (10 mg/kg, i.p. ■) ou do veículo (DMSO, 1% 0,1 ml/10g de animal, □). no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Nas ordenadas estão representados os números da contorções abdominais induzidas pelo ácido acético durante 20 min. e na abcissas o tempo em minutos de pré tratamento. Os símbolos e a barras verticais representam as médias \pm E.P.M. de 6 animais por grupo experimental. Difere estatisticamente do tempo zero (*P < 0,05 e **P < 0,01)

4.1.2.2. TESTE DA FORMALINA EM CAMUNDONGOS.

A injeção intraplantar de 20 μ l de formalina a 2,5% (formaldeído 0,92%) na pata posterior direita de camundongos induziu um quadro nociceptivo intenso com duas fases bem definidas, e parcialmente, a formação de edema. Na primeira fase (dor de origem neurogênica), a resposta dos animais tratados previamente com veículo por via i.p. foi de $67,4 \pm 3,9$ segundos (s) e por via oral foi de $68,9 \pm 4,5$ s (Figuras 14 A e 15A). Enquanto que na segunda fase (dor de origem inflamatória), o tempo de reatividade foi de $171,5 \pm 14,8$ s (i.p.) ou $173,2 \pm 20,64$ s (v.o.) (Figuras 14 B e 15B), e a formação do edema foi de $79,0 \pm 5,0$ mg (i.p.) ou $98,0 \pm 8,0$ mg (v.o.) (Figuras 14C e 15C)

O tratamento prévio dos animais por via i.p. com a F - CH₂Cl₂ (1,0 mg/kg) reduziu significativamente a reatividade na primeira fase de nocicepção em 37,8 % (Figura 14A)($p < 0,05$) e a segunda fase em 50,3 % (Figura 14B) ($p < 0,01$). Já as doses de 3 ou 10 mg/kg da F - CH₂Cl₂ por via i.p. reduziram significativamente somente a segunda fase de nocicepção em 55,6 e 92,5% (Figura 14B)($p < 0,01$), respectivamente. O edema produzido pela formalina foi reduzido significativamente em 45,5% ($p < 0,01$), somente na dose de 10 mg/kg da F - CH₂Cl₂ (Figura 14C).

Em relação à via oral, o tratamento prévio dos animais, com a F - CH₂Cl₂ (30 mg/kg), inibiu significativamente a reatividade de ambas as fases de nocicepção em 39,8 e 99,7% (figura 15A e 15B)($p < 0,01$), respectivamente, bem como a formação do edema em 41,8% ($p < 0,05$). Já a F - CH₂Cl₂ na dose de 10 mg/kg, determinou apenas inibição significativa da reatividade da segunda fase de nocicepção de

71,9% (Figura 15B). O valor estimado das DI_{50} para a segunda fase da nocicepção por via i.p. foi de 1,65 (0,81 – 3,58) mg/kg e por via oral foi de 6,45 (4,64 – 8,24) mg/kg. A indometacina (10 mg/kg, i.p.), usado como controle positivo, reduziu significativamente apenas a reatividade da segunda fase de nocicepção em 43,6% ($p < 0,01$).

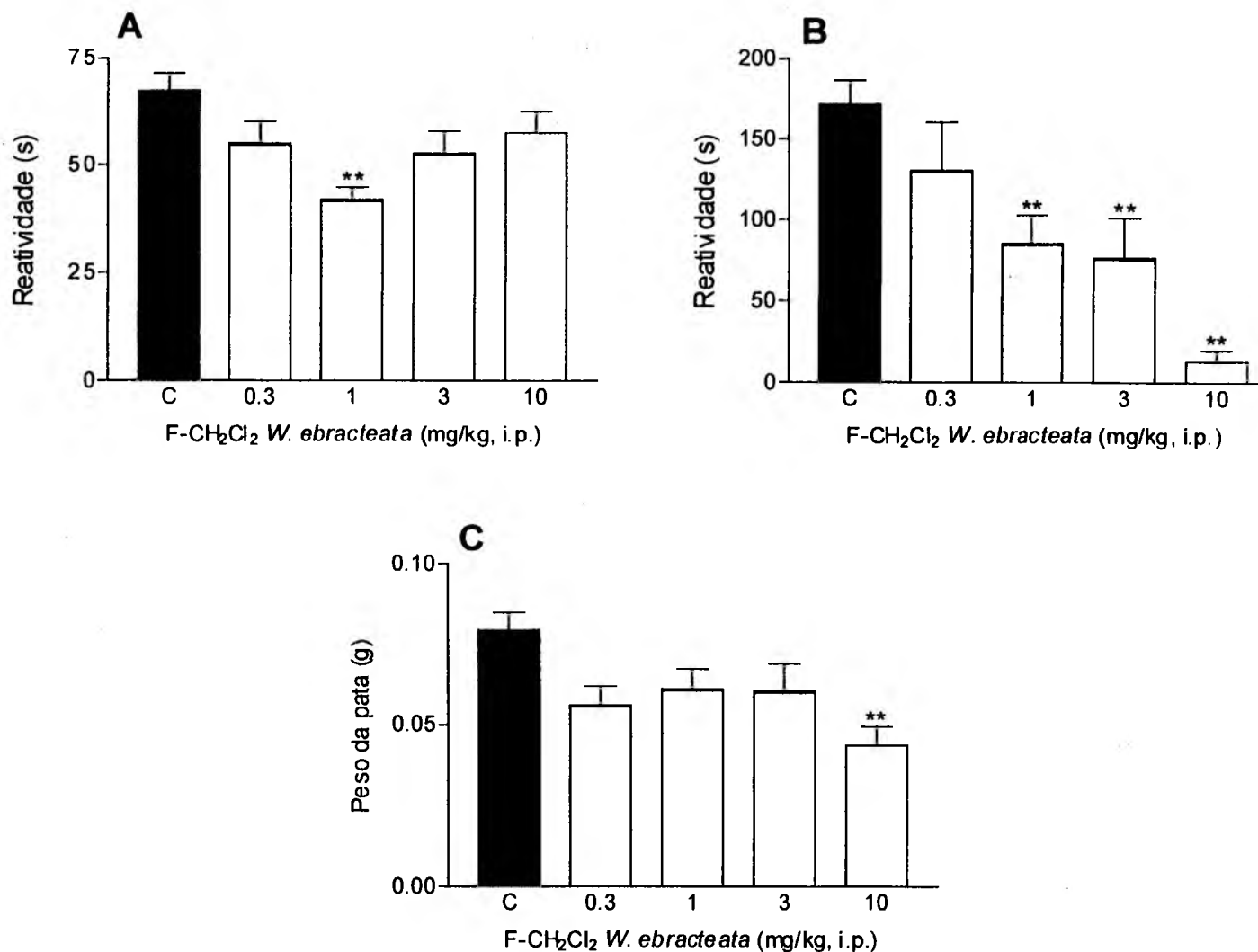


Figura 14. Efeito antinociceptivo promovido pela F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (0,3 – 10 mg/kg, i.p.) administrada 30 min antes, sobre a reatividade da primeira fase (A) e segunda fase (B) e do edema de pata (C) induzidos pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. As colunas e as barras verticais representam as médias \pm E.P.M. de 6 a 10 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), **P < 0,01.

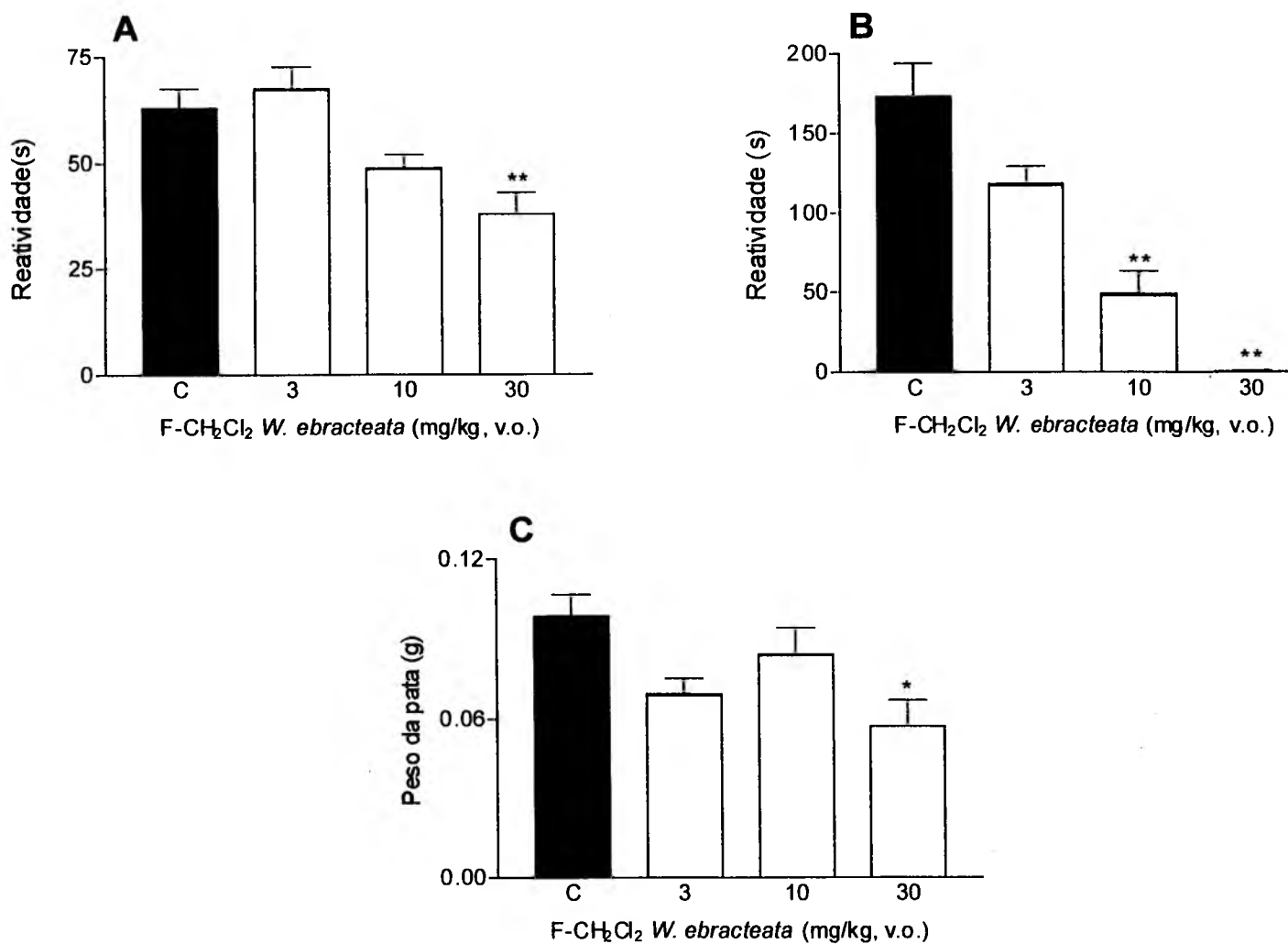


Figura 15. Efeito antinociceptivo promovido pela F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (3 – 30 mg/kg, i.p.) administrada 60 min antes, sobre a reatividade da primeira fase (A) e segunda fase (B) e do edema de pata (C) induzidos pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm E.P.M. de 6 a 10 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), *P < 0,05; **P < 0,01.

4.1.2.3. TESTE DO *TAIL-FLICK* EM CAMUNDONGOS

Nos animais injetados com o veículo pela via i.p., o tempo de reatividade ao estímulo térmico nociceptivo, 30 min após o tratamento, foi de $9,6 \pm 1,5$ s. O tratamento com a F-CH₂Cl₂ (10 mg/kg, i.p.) não alterou significativamente a reatividade dos animais ao estímulo nociceptivo durante os 45 min de avaliação experimental. No entanto, os animais tratados com morfina, controle positivo (10mg/kg, s.c.), a reatividade dos animais ao estímulo térmico, após 30 min de tratamento, foi aumentada significativamente para $21,3 \pm 3,8$ s ($p < 0,01$) (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito do tratamento com morfina (s.c.) ou com a F-CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (i.p.) no teste do *Tail-flick*

Tratamento	Dose(mg/kg)	Latência (s)
Controle		$9,63 \pm 1,59$
F-CH ₂ Cl ₂	10	$9,48 \pm 1,26$
Morfina	10	$21,34 \pm 3,88^{**}$

(n = 6 animais)

Difere significativamente em relação ao controle, $^{**}p < 0,01$.

4.1.3. ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

4.1.3.1. TESTE DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM RATOS

No grupo de animais tratados com veículo (0,1 ml/100g) (grupo controle) por via i.p. ou por v.o., a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) promoveu a formação de um edema progressivo, que em 240 min após a injeção do agente flogístico foi de $0,73 \pm 0,05$ e de $0,88 \pm 0,06$ ml, respectivamente. O tratamento dos animais por via i.p., 30 min antes da carragenina, com a F - CH₂Cl₂ nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg inibiu significativamente de maneira dose – dependente o edema de pata em 26,3; 60,0 e 77,7%, para as respectivas doses ($p < 0,01$) (Tabela 7, Figura 16). O valor da DI₅₀ estimada para o tratamento por via i.p. foi de 1,86(0,62-5,73) mg/kg. No grupo controle positivo, o tratamento dos animais com indometacina (10 mg/kg, i.p., 30 min) inibiu significativamente o edema formado pelo agente flogístico em 58,3% ($p < 0,01$) (Tabela 7).

Nas mesmas condições experimentais, o tratamento por v.o. dos animais 60 min antes da carragenina com a F-CH₂Cl₂, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, produziu o mesmo perfil de resposta anterior, com inibição significativa do edema de pata em 34,4; 48,1 e 58,4%, para as respectivas doses ($p < 0,01$) (Tabela 8, Figura 17). O valor da DI₅₀ estimada para este tratamento foi de 15,84 (10,39 - 23,98) mg/kg. Da mesma maneira, a indometacina (10 mg/kg, v.o., 60 min) promoveu inibição do edema formado em 65,2% ($p < 0,01$)(Tabela 8).

Para avaliar as frações purificadas da F-CH₂Cl₂ grupos experimentais foram tratados com as diferentes frações purificadas (FP-I - FP-X). Apenas o tratamento

dos animais com a FP-III (3 mg/kg, i.p. 30 min), inibiu significativamente o edema formado pelo agente flogístico em 47,7% (em 240 min.) ($p < 0,01$). No entanto A FP-II (3 mg/kg) reduziu significativamente o edema produzido pela carragenina, apenas em 30 min ($p < 0,01$) e a FP-IX promoveu uma redução significativa do edema nos tempo de 60 ($P < 0,05$) e 120 min ($p < 0,01$)(Tabela 9).

Os efeitos dos compostos isolados, também foram avaliados, no edema de pata induzido pela carragenina. O tratamento por via i.p. com diidrocucurbitacina B (1mg/kg, i.p.), o principal composto da F-CH₂Cl₂, não foi capaz de inibir significativamente o edema formado. Já os tratamentos por via i.p. tanto com cucurbitacina B (1 mg/kg) ou com cucurbitacina E (1 mg/kg) reduziram significativamente o edema de pata induzido pela carragenina em 60,8 e 58,1%, respectivamente ($p < 0,01$) (Tabela 10).

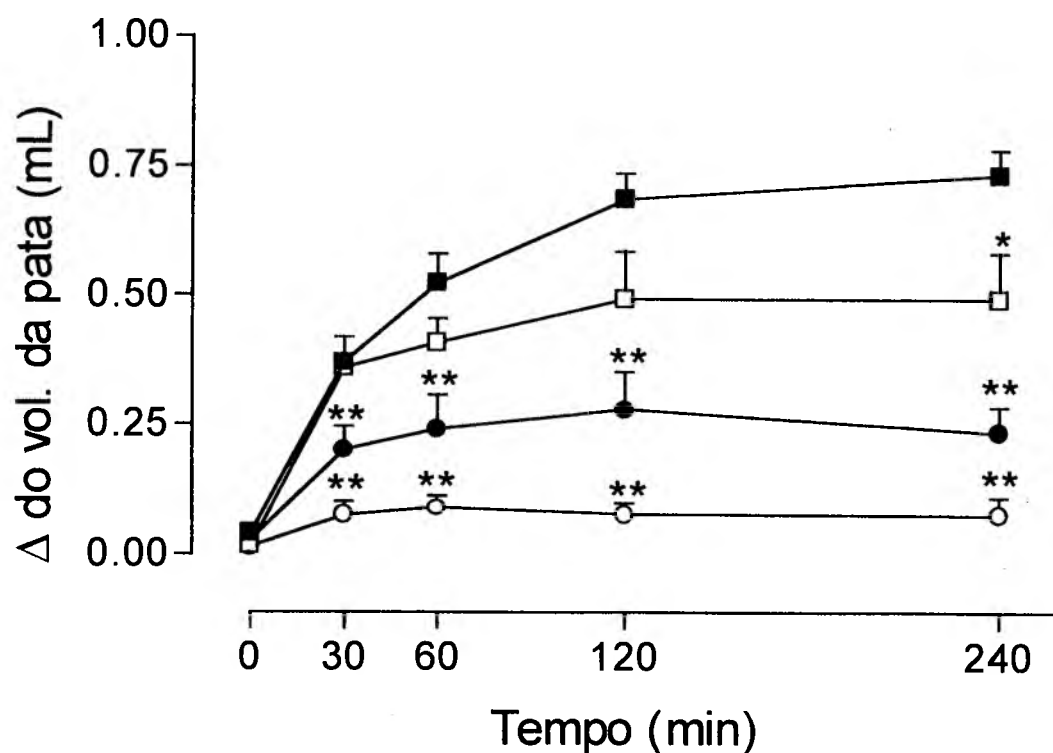


Figura 16. Efeito antiedematogênico induzido pela F-CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (1mg/kg, □, 3 mg/kg, ● ou 10mg/kg, ○), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300 μg/pata) em ratos. Animais que receberam apenas veículo (controle, ■). Os símbolos e barras verticais representam as médias ± E.P.M. de 6 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, *p<0,05 ou **p< 0,01.

Tabela 7. Efeito antiedematogênico produzido pela F-CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* e pela indometacina administradas por via intraperitoneal (i.p.) sobre o edema de pata induzido pela carragenina em ratos.

Grupos	Dose (mg/kg, i.p.)	Edema (ml) (média ± EPM)				¹ Inibição do edema (%)
		30min	60 min	120 min	240 min	
Controle		0.37±0.04	0.52±0.06	0.68±0.05	0.73±0.05	0.0
F - CH ₂ Cl ₂	1	0.36±0.02	0.41±0.05	0.49±0.09	0.49±0.09*	26.3
	3	0.20±0.06**	0.24±0.06**	0.28±0.07**	0.23±0.05**	60.0
	10	0.07±0.02**	0.09±0.02**	0.23±0.05**	0.07±0.03**	77.7
Indometacina	10	0.15±0.04**	0.19±0.03**	0.28±0.04**	0.33±0.06**	58.3

(n = 6 animais).

Difere significativamente em relação ao controle * p < 0,05 e ** p < 0,01

¹ A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva

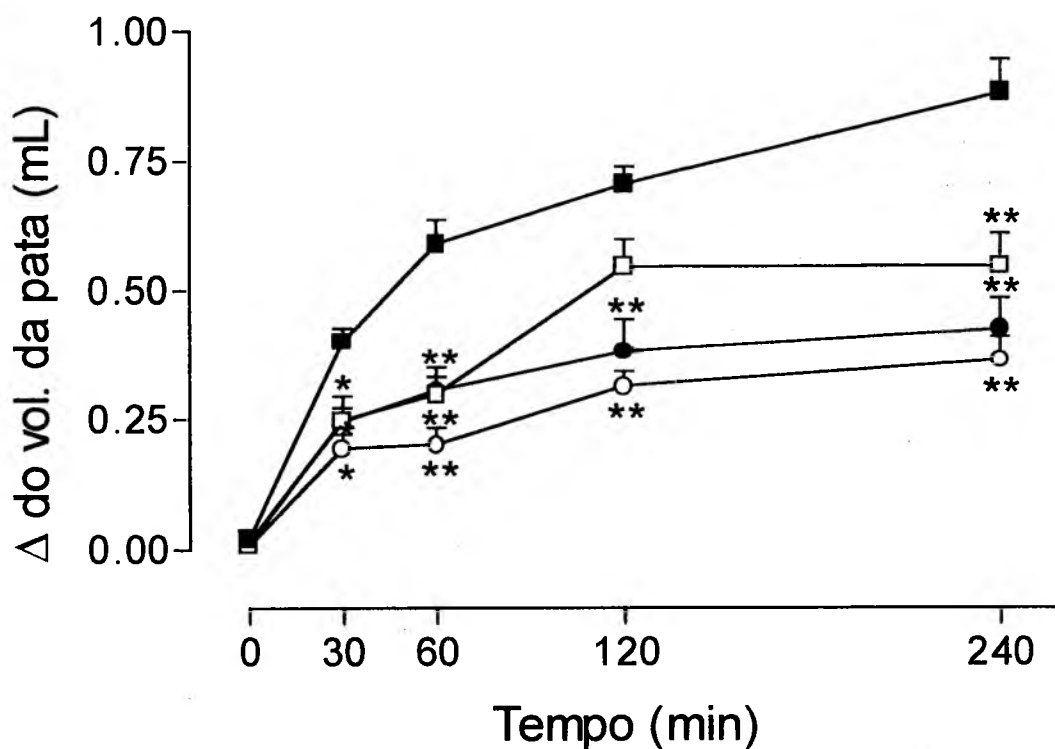


Figura 17. Efeito antiedematogênico induzido pela F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (3 mg/kg, □, 10 mg/kg, ● ou 30mg/kg, ○), administrados por via oral (v.o.) 60 min antes, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300 μg/pata) em ratos. Animais que receberam apenas veículo (controle, ■). Os símbolos e barras verticais representam as médias ± E.P.M. de 6 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, *p<0,05 ou **p< 0,01.

Tabela 8. Efeito antiedematogênico produzido pela F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* e pela indometacina administradas por via oral (v.o.) sobre o edema de pata induzido pela carragenina em ratos.

Grupos	Dose (mg/kg, oral)	Edema (ml) (média ± EPM)				¹ Inibição do edema (%)
		30min	60 min	120 min	240 min	
Controle		0.40±0.06	0.59±0.11	0.70±0.08	0.88±0.06	0.0
F - CH ₂ Cl ₂	3	0.24±0.02*	0.29±0.03**	0.54±0.05	0.54±0.06**	34.4
	10	0.24±0.02*	0.30±0.04**	0.38±0.06**	0.42±0.06**	48.1
	30	0.19±0.02*	0.20±0.03**	0.31±0.02**	0.36±0.04**	58.4
Indometacina	10	0.20±0.02**	0.21±0.01**	0.26±0.04**	0.24±0.03**	65.2

(n = 6 animais).

Difere significativamente em relação ao controle * p < 0,05 e **p < 0,01

¹ A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva

Tabela 9. Efeito antiedematogênico produzido pelas Frações Purificadas da F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (FP-I a FP - X), administradas por via intraperitoneal (i.p.) sobre o edema de pata induzido pela carragenina em ratos.

Grupos	Dose (mg/kg, i.p.)	Edema (ml) (média ± EPM)				Inibição do edema (%)
		30min	60min	120min	240min	
Controle		0,31 ± 0,03	0,49 ± 0,05	0,67 ± 0,08	0,74 ± 0,07	0,0
FP - I	3,0	0,20 ± 0,04	0,27 ± 0,09	0,54 ± 0,07	0,59 ± 0,08	29,1
FP - II	3,0	0,06 ± 0,01**	0,27 ± 0,01	0,56 ± 0,04	0,46 ± 0,01	39,4
FP - III	3,0	0,28 ± 0,04	0,31 ± 0,06	0,29 ± 0,07**	0,33 ± 0,08**	43,2
FP - IV	10,0	0,24 ± 0,01	0,35 ± 0,08	0,66 ± 0,12	0,73 ± 0,15	12,4
FP - V	10,0	0,31 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,38 ± 0,06	0,46 ± 0,04	30,8
FP - VI	10,0	0,19 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,74 ± 0,05	0,71 ± 0,01	9,1
FP - VII	10,0	0,45 ± 0,07	0,61 ± 0,05	0,51 ± 0,04	0,52 ± 0,03	1,1
FP - VIII	10,0	0,35 ± 0,01	0,43 ± 0,05	0,48 ± 0,07	0,59 ± 0,09	15,1
FP - IX	10,0	0,14 ± 0,07	0,19 ± 0,04*	0,26 ± 0,05**	0,46 ± 0,03	55,1
FP - X	10,0	0,29 ± 0,07	0,58 ± 0,12	0,94 ± 0,07	0,83 ± 0,02	-

(n = 4 - 6 animais).

Difere significativamente em relação ao controle * p < 0.05 e ** p < 0.01

¹ A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva

Tabela 10. Efeito antiedematogênico produzido pela diidrocurbitacina B, cucurbitacina B ou E compostos isolados da FP-III de *W. ebracteata* administradas por via intraperitoneal (i.p.), sobre o edema de pata induzido pela carragenina em ratos.

Grupos	Dose (mg/kg, i.p.)	Edema (ml) (média ± EPM)				Inibição do edema (%)
		30min	60min	120min	240min	
Controle		0,35 ± 0,02	0,54 ± 0,08	0,70 ± 0,08	0,86 ± 0,07	0,0
Diidrocur - B	1.0	0,38 ± 0,05	0,50 ± 0,10	0,66 ± 0,07	0,67 ± 0,08	8,6
Cucurbitacina B	1.0	0,08 ± 0,01**	0,12 ± 0,02**	0,26 ± 0,05**	0,44 ± 0,09**	60,8
Cucurbitacina E	1.0	0,07 ± 0,01**	0,11 ± 0,03**	0,20 ± 0,04**	0,60 ± 0,04**	58,1

(n = 4 - 6 animais).

Difere significativamente em relação ao controle * p < 0,05 e ** p < 0,01

¹ A percentagem de inibição do edema foi determinada através do cálculo da área sob a curva

4.1.3.2. EFEITO DA F - CH₂Cl₂ NO TESTE DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA - AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES ENDÓGENOS EM RATOS.

Nos animais adrenalectomizados bilateralmente (ADL) ou falsos operados (FO), tratados com o veículo por via i.p., a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) promoveu a formação de um edema progressivo, que 240 min após a injeção deste foi de $1.09 \pm 0,10$ e $0.92 \pm 0,09$ ml, respectivamente. O pré-tratamento (30 min) dos animais ADL ou FO com a F - CH₂Cl₂ na dose de 10 mg/kg (i.p.) inibiu significativamente o edema de pata induzido pela carragenina em 51,8 ou 62,7%, respectivamente, 240 min após a aplicação ao agente flogístico ($p < 0,01$)(Tabela 11, Figura 18).

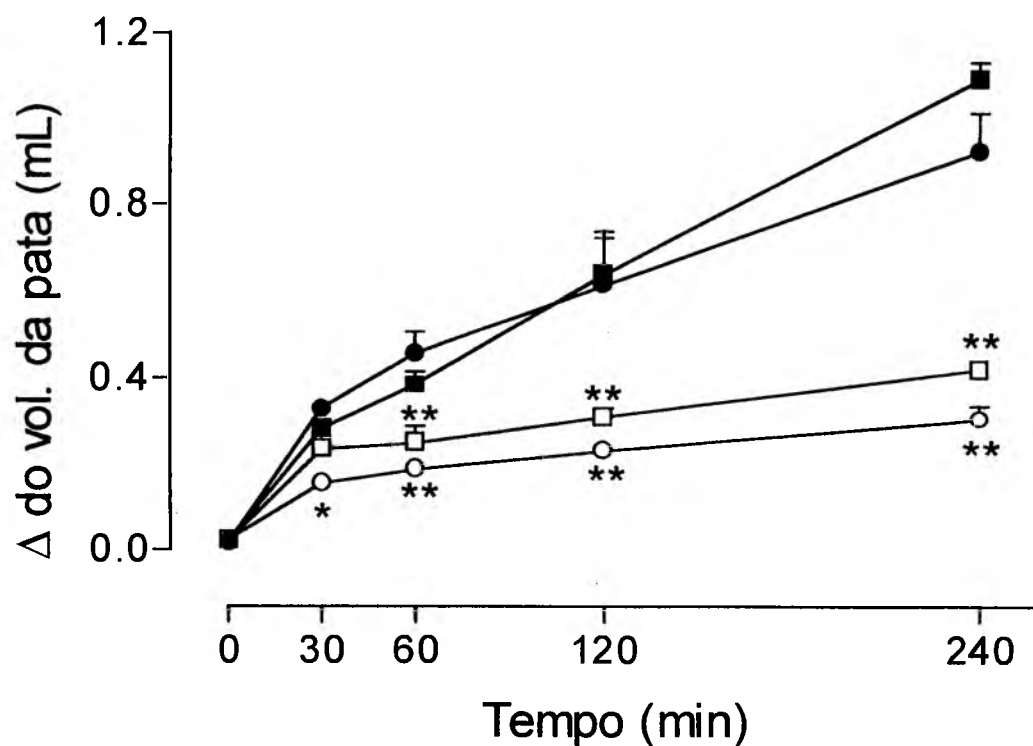


Figura 18. Efeito antiedematogênico da F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (10 mg/kg; ADL, □ e FO, ○), administrados por via intraperitoneal (i.p.), 30 min antes, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (300 μg/pata) em ratos. Animais que receberam apenas veículo (controle; ADL, ■ e FO, ●). Os símbolos e barras verticais representam as médias ± E.P.M. de 6 animais por grupo experimental. Difere significativamente dos respectivos grupo controle, *p<0,05 ou **p< 0,01.

Tabela 11. Efeito antiedematogênico da F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* administrada por via intraperitoneal (i.p.) sobre o edema de pata induzido pela carragenina em ratos adrenalectomizados bilateralmente (ADL) ou falso operados (FO).

Grupo experimental	F - CH ₂ Cl ₂ (mg/kg, i.p.)	Edema (ml) (média ± EPM)				Inibição do edema (%)
		30min	60 min	120 min	240 min	
ADL controle		0.28±0.01	0.38±0.03	0.63±0.10	1.09±0.04	
ADL tratado	10	0.25±0.04	0.25±0.04**	0.31±0.02**	0.42±0.01**	51,8
FO controle		0.33±0.01	0.45±0.05	0.61±0.11	0.92±0.09	
FO tratados	10	0.15±0.01*	0.18±0.01**	0.23±0.01**	0.30±0.03**	62,7

(n = 6 animais).

Difere significativamente em relação ao controle* p < 0,05 e **p < 0,01

4.1.3.3. TESTE DA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

A injeção de carragenina (1%) na cavidade pleural de camundongos tratados com o veículo (grupos controles), promoveu aumento tanto do extravasamento plasmático ($6,70 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$) quanto da migração celular ($7,28 \pm 0,58 \times 10^6$ células/ml) (Tabela 12, Figura 19). O aumento da migração celular foi às custas principalmente de neutrófilos ($5,18 \pm 0,6 \times 10^6$ células/ml), sendo que o número de células mononucleares não foi diferente dos resultados do grupo injetado com salina (Figura 19).

Primeiramente, os animais foram tratados com a F - CH_2Cl_2 (0,01 – 10 mg/kg, i.p.) 30 min antes da aplicação do agente flogístico. Nas doses de 0,3 a 10 mg/kg (i.p.), houve redução significativa e de maneira independente da dose, tanto do extravasamento plasmático quanto da migração celular em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) (Tabela 12, Figura 19).

Em outro grupo experimental, os animais foram tratados com a FP – III (3,0 mg/kg; i.p.), 30 min antes da injeção de carragenina. Este tratamento inibiu o extravasamento plasmático em torno de 50% ($3,09 \pm 0,71 \mu\text{g/ml}$) e a migração celular em torno de 80% ($1,5 \pm 0,09 \times 10^6$ células/ml) em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O mesmo efeito inibitório foi observado quando os animais foram tratados com cucurbitacina E (1,0 mg/kg; i.p.), no qual o extravasamento plasmático foi inibido em torno de 50% ($3,89 \pm 1,27 \mu\text{g/ml}$) e a migração celular em torno de 50% ($3,67 \pm 1,29 \times 10^6$ células/ml) ($p < 0,01$) (Tabela 12).

Como grupo controle positivo, os animais foram tratados por via i.p. com indometacina (5 mg/kg) ou com dexametasona (0,5 mg/kg), 30 min antes da aplicação do agente flogístico. A tabela 12 mostra que estes tratamentos reduziram significativamente o extravasamento plasmático e a migração celular em relação ao controle ($p < 0,01$). As percentagens de inibição do extravasamento plasmático e da migração celular para os diferentes tratamentos foram de 91,9 e 62,5%, para indometacina e de 95,7 e 69,5 % para dexametasona.

A figura 20 demonstra os efeitos da administração por v.o. da F-CH₂Cl₂ (3 – 30 mg/kg), todas as doses utilizadas foram efetivas em inibir o extravasamento plasmático e a migração celular induzidos pela carragenina na cavidade pleural de camundongos (Tabela 12, Figura 20).

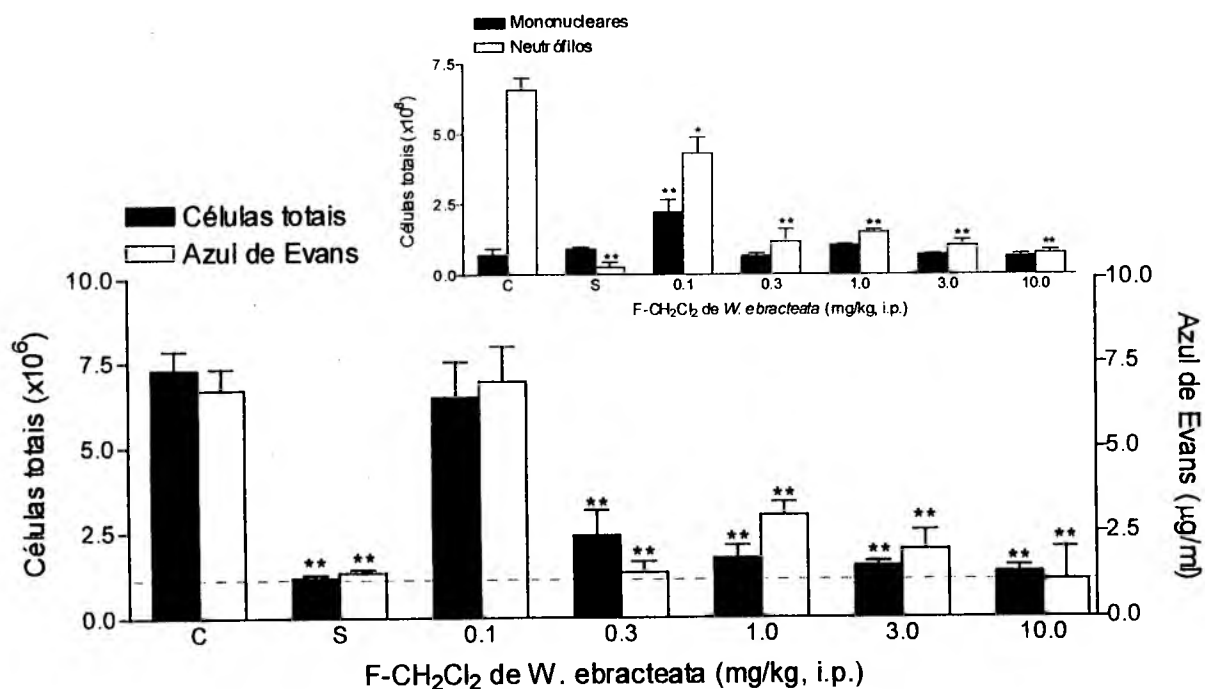


Figura 19. Efeito antiinflamatório da F - CH_2Cl_2 de *W. ebracteata* (0,01 – 10 mg/kg) administrada por via i.p., 30 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. Nos gráficos, C indica o grupo controle injetado com carragenina e S indica os animais tratados com salina na cavidade pleural. No painel maior, as colunas fechadas indicam as células totais ($\times 10^6$) e as abertas o exsudato ($\mu\text{g/ml}$). No painel menor, as colunas fechadas indicam os mononucleares ($\times 10^6$) e as abertas indicam os neutrófilos ($\times 10^6$). As linhas tracejadas indicam os valores normais. As colunas e barras verticais representam as médias \pm E.P.M. de 6 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$.

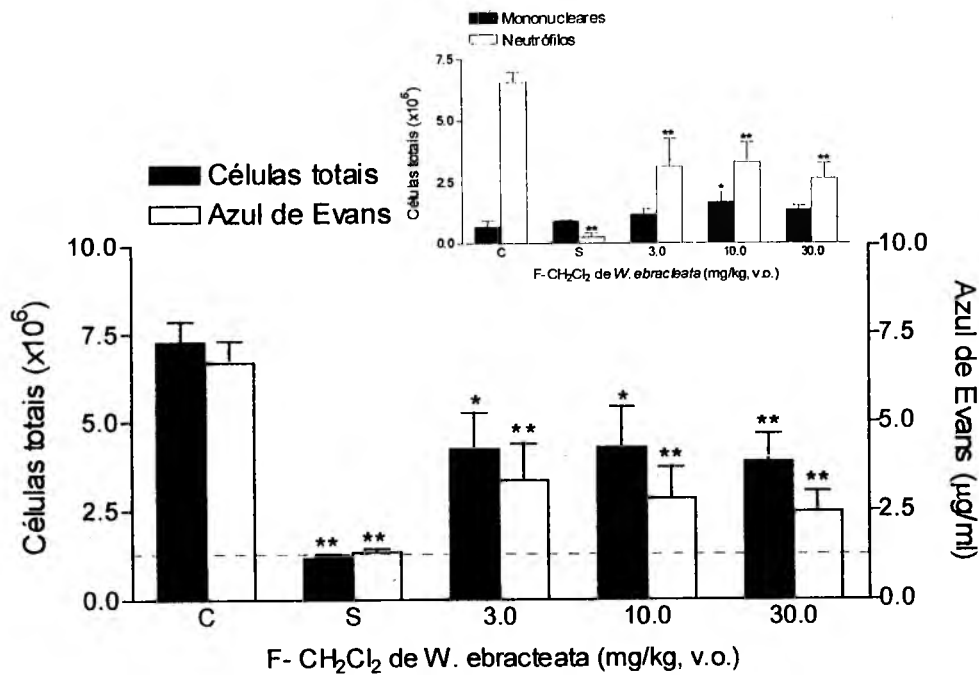


Figura 20. Efeito antiinflamatório da F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (3 – 30 mg/kg), administrada por v.o. 60 min antes da pleurisia induzida pela carragenina (1%) em camundongos. Nos gráficos, C indica o grupo controle injetado com carragenina e S indica os animais tratados com salina na cavidade pleural. No painel maior as colunas fechadas indicam as células totais (x 10⁶) e as abertas o exsudato (µg/ml). No painel menor, as colunas fechadas indicam os mononucleares (x 10⁶) e as abertas indicam os neutrófilos (x 10⁶). As linhas tracejadas indicam os valores normais. As colunas e barras verticais representam as médias ± E.P.M. de 6 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, *p<0,05 ou **p< 0,01.

Tabela 12. Efeito antiinflamatório causado pela administração por via i.p. ou por v.o. da F - CH₂Cl₂, FP-III e cucurbitacina E de *W. ebracteata*, de indometacina ou de dexametasona na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Células Totais (x10 ⁶)	Azul de Evans (µg/ml)
Controle		7,28 ± 0,58	6,70 ± 0,62
F - CH ₂ Cl ₂ (i.p.)	0,1	6,48 ± 1,04	6,94 ± 1,04
	0,3	2,42 ± 0,73**	1,33 ± 0,33**
	1	1,75 ± 0,39**	3,00 ± 0,40*
	3	1,51 ± 0,15**	2,00 ± 0,57*
	10	1,32 ± 0,20**	1,10 ± 0,96**
F - CH ₂ Cl ₂ (v.o.)	3	4,23 ± 1,04*	3,35 ± 1,05**
	10	4,27 ± 1,15*	2,83 ± 0,90**
	30	3,87 ± 0,80*	2,46 ± 0,59**
FP - III (i.p.)	3,0	1,50 ± 0,09**	3,09 ± 0,71**
Cucurbitacina E (i.p.)	1,0	3,67 ± 1,29*	3,89 ± 1,27**
Indometacina (i.p.)	5	2,86 ± 0,60**	0,60 ± 0,03**
Dexametasona (i.p.)	0,5	2,32 ± 0,46**	0,32 ± 0,04**

(n = 4 - 6 animais).

Difere significativamente em relação ao grupo controle * p < 0.05, ** p < 0.01

4.1.3.4. DOSAGEM DOS NÍVEIS DE PGE₂ NO EXSUDATO PLEURAL INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.

A aplicação de carragenina (1%) na cavidade pleural de camundongos tratados com o veículo (grupo controle) induziu um significativo aumento do nível de PGE₂ de 0.72 ± 0.23 ng/ml (animais injetados com salina) para $25,5 \pm 5,9$ ng/ml, 4 h após a administração do agente flogístico. O nível de PGE₂ na cavidade pleural diminuiu significativamente de maneira dose-dependente, em relação ao grupo controle, quando os animais foram tratados com a F - CH₂Cl₂ tanto por via i.p. (0,001 – 10 mg/kg) quanto por v.o. (0,03 – 10 mg/kg), 30 e 60 min, respectivamente, antes da aplicação da carragenina na cavidade pleural de camundongos. Os valores calculados da DI₅₀ para o tratamento por via i.p. foram de 0,02 (0,002 – 0,09) mg/kg (Figura 21A) e por v.o. de 0,29 (0,06 – 1,45) mg/kg (Figura 21B).

A tabela 13 mostra que o aumento do nível de PGE₂ induzido pela carragenina também foi inibido quando os animais foram tratados por via i.p. com cucurbitacina B (0,1 mg/kg) em 59,2% ($p < 0,01$). O mesmo efeito inibitório ocorreu com os animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.), no qual a inibição do nível de PGE₂ foi de 98,8% ($p < 0,01$)(Tabela 13).

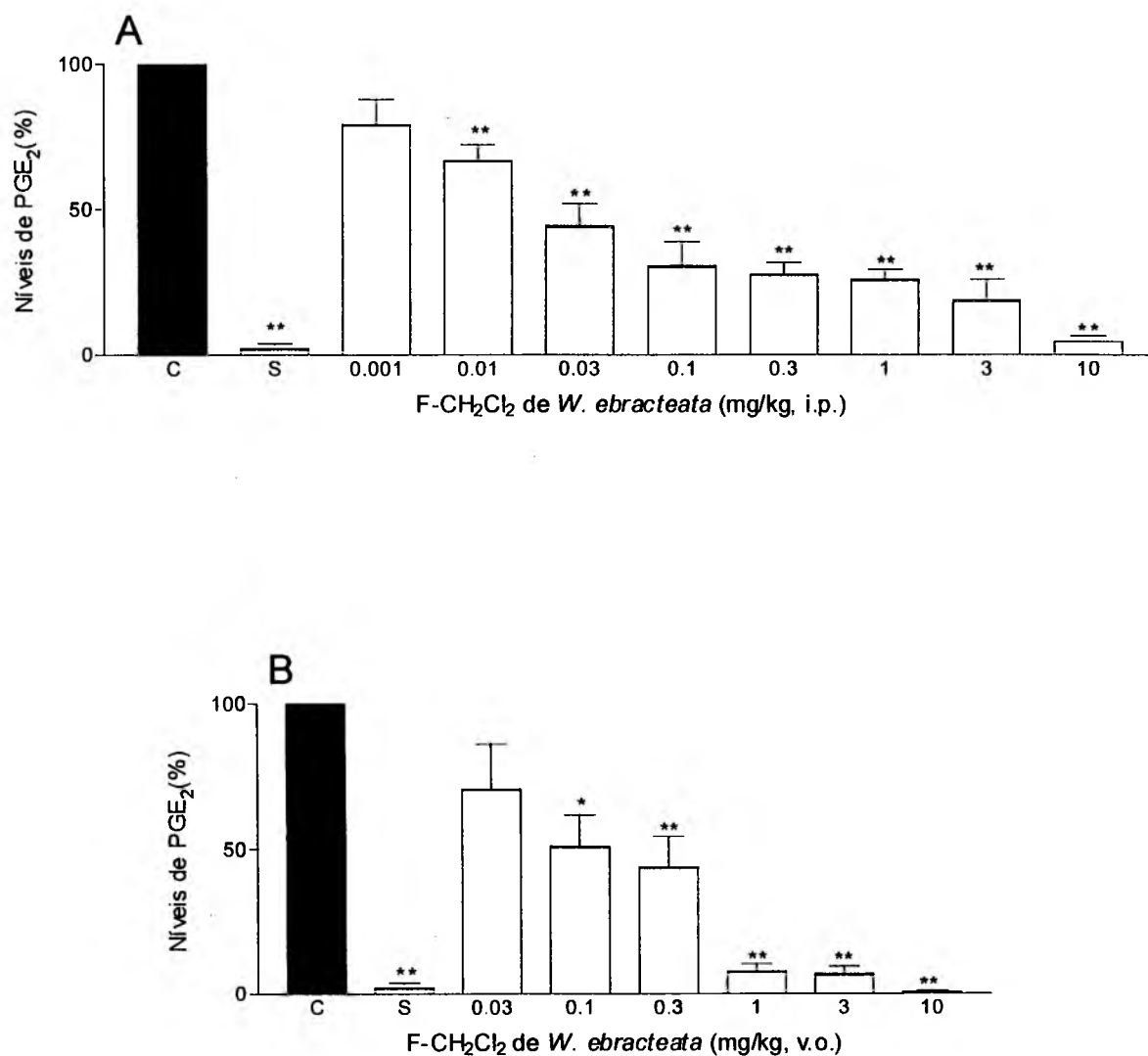


Figura 21. Efeito da administração de F - CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* (3 – 30 mg/kg, i.p. **A**, 30 min antes ou 0,03 – 10 mg/kg, v.o., **B** 60 min antes) sobre o nível de PGE₂ induzido pela aplicação da carragenina (1%) na cavidade pleural em camundongos. Nos gráficos, C indica o grupo controle injetado com carragenina e S indica os animais tratados com salina na cavidade pleural. As colunas e barras verticais representam as médias \pm E.P.M. de 4 a 6 animais por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$.

Tabela 13. Efeito da cucurbitacina B isolada da FP-III de *W. ebracteata* ou da indometacina sobre os níveis de PGE₂ induzido pela carragenina na cavidade pleural de camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg, i.p.)	Níveis de PGE ₂ (ng/ml)	Inibição dos níveis de PGE ₂ (%)
Salina	-	0,72 ± 0,23	-
Carragenina	-	25,53 ± 5,90	-
Cucurbitacina B	0.1	10,41 ± 2,67**	59.2
Indometacina	10	0,29 ± 0,08**	98.8

(n = 4 – 6)

Difere significativamente do grupo controle **p < 0,01

4.1.3.5. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA F – CH₂Cl₂ DE *W. ebracteata* SOBRE A MUCOSA GÁSTRICA EM RATOS.

O tratamento dos animais com indometacina (30 mg/kg, v.o. ou i.p.) produziu intensas lesões na mucosa gástrica, 4 h após sua administração (Tabela 14, Figura 22A). O mesmo ocorreu com os animais tratados com AAS (100 mg/kg, v.o.), porém com um índice de ulceração (IU) menos intenso (Tabela 14). No entanto o tratamento dos animais com o veículo (DMSO 10%) bem como com a F-CH₂Cl₂ (30 mg/kg, v.o. ou i.p.) não produziu lesões gástricas (Tabela 14, Figura 22B).

Tabela 14. Efeito da administração por via oral do veículo, F-CH₂Cl₂ de *W. ebracteata*, indometacina ou AAS sobre a mucosa gástrica de ratos.

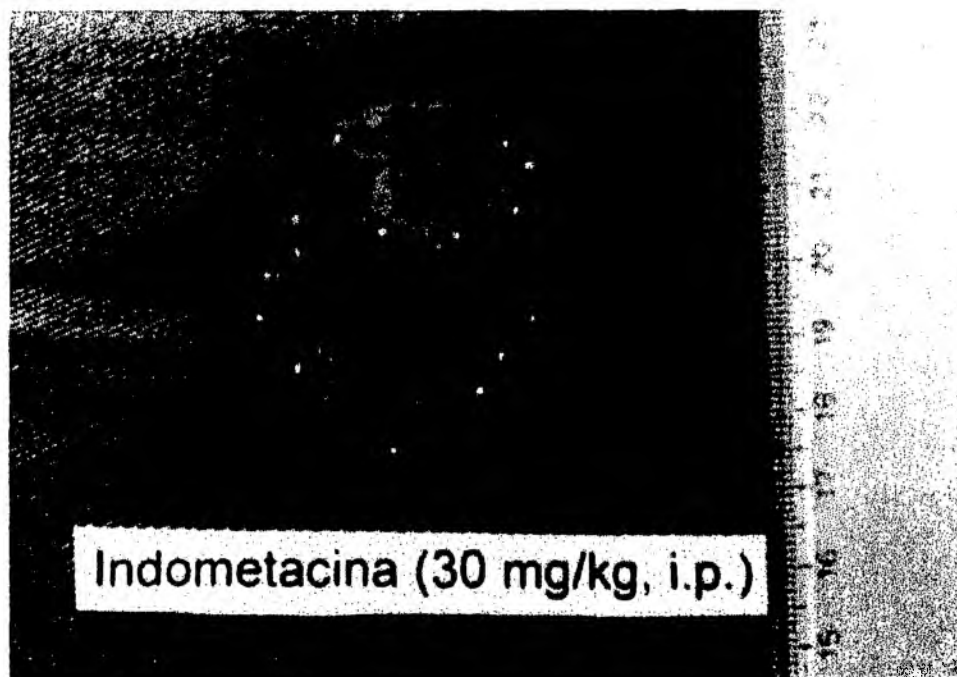
Amostra	Dose (mg/kg)	IU ¹ média ± EPM
Veículo	-	0
F-CH ₂ Cl ₂ (i.p.)	10	0
F-CH ₂ Cl ₂ (v.o.)	30	0
Indometacina (i.p.)	30	5,0 ± 0,25
Indometacina (v.o.)	30	4,0 ± 0,63
AAS (v.o.)	100	2,6 ± 0,80

n = 6 - 8 animais.

Difere significativamente em relação ao grupo controle **p < 0,01

¹ índice de ulceração

A



B

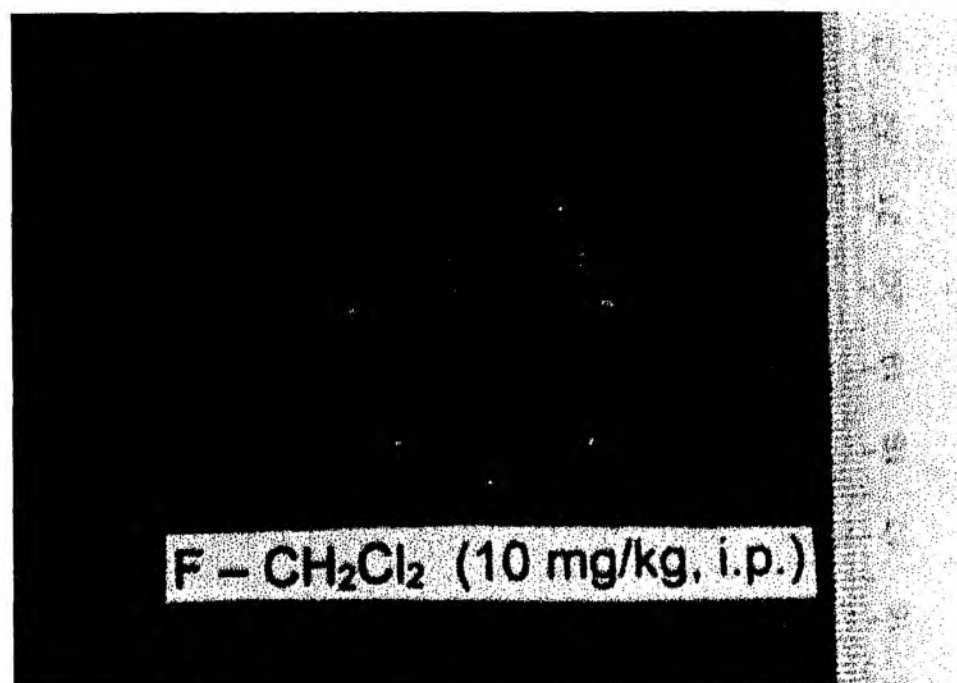


Figura 22. Registro fotográfico típico dos efeitos da indometacina (30 mg/kg, i.p., A) e F-CH₂Cl₂ *W. ebracteata* (10 mg/kg, i.p., B) sobre a mucosa gástrica de ratos.

4.2. ESTUDOS BIOQUÍMICOS "IN VITRO"

4.2.1. ESTUDOS DO EFEITO DA F - CH₂Cl₂ e FP-III de *W. ebracteata* SOBRE A ATIVIDADE DA CICLOOXIGENASE HUMANA 2 (hCOX-2).

A adição de ácido araquidônico (40 μ M) nos recipientes contendo células Cos-7 transfectadas com hCOX-2, produziu $252,0 \pm 21,4$ ng/ml de PGE₂, este valor foi assumido como 100% de atividade enzimática para a enzima COX-2. A pré incubação com F-CH₂Cl₂, nas concentrações de 25 e 250 μ g/ml, diminuiu significativamente a atividade enzimática de COX-2 para $54,9 \pm 13,4$ e $73,1 \pm 3,7\%$, respectivamente. Na presença da FP-III, nas mesmas concentrações (25 ou 250 μ g/ml), a atividade enzimática de COX-2 foi reduzida significativamente para $48,7 \pm 12,7$ e $25,1 \pm 6,5\%$, respectivamente em relação ao controle. A pré-incubação com indometacina (0,5 μ g/ml), um inibidor não seletivo de COX-1 e COX-2, em células COS-7, transfectadas com hCOX-2, produziu uma diminuição significativa da atividade enzimática de COX-2 para $9,0 \pm 1,3\%$. O mesmo efeito inibitório ocorreu quando estas células foram pré-incubadas com NS-398 (0,5 μ g/ml), um inibidor seletivo de COX-2, que reduziu a atividade enzimática de COX-2 para $5,0 \pm 0,79\%$, em relação ao controle (Figura 23).

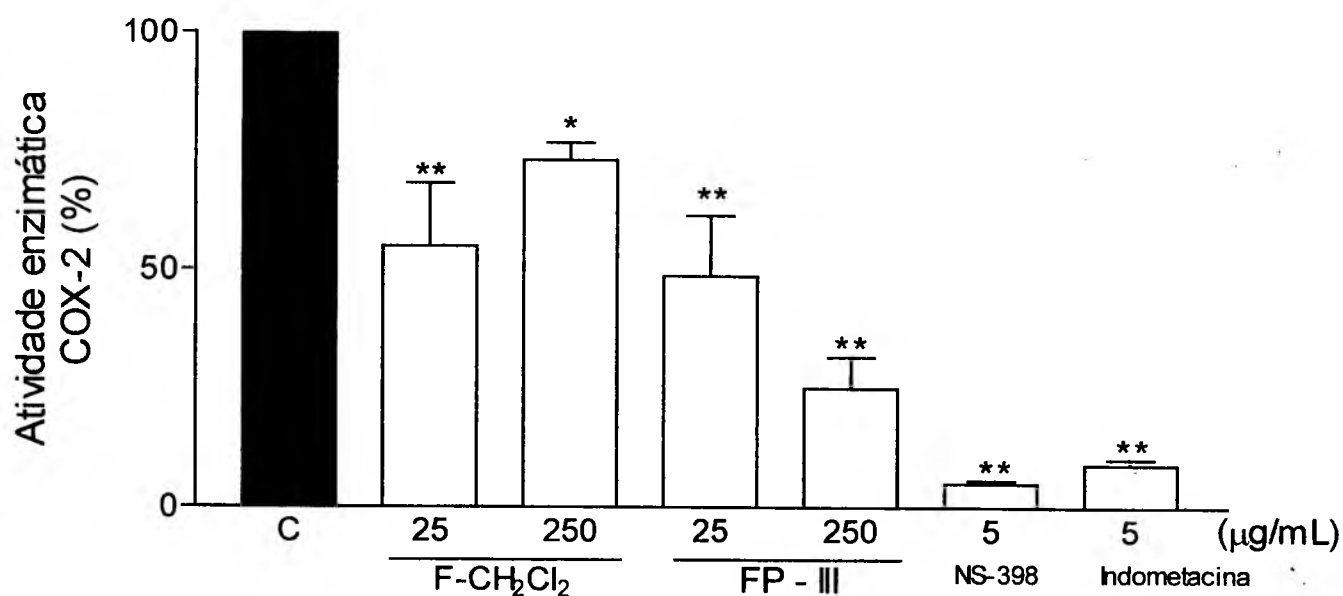


Figura 23. Avaliação da atividade enzimática de COX-2 em células COS-7 transfectadas com hCOX-2 pré-incubadas por 45 min com F-CH₂Cl₂ ou F-III de *W. ebracteata*, NS-398 ou indometacina. No gráfico, C indica o grupo controle, pré incubado com o veículo. As colunas e barras verticais representam as médias \pm E.P.M. de 3 a 6 amostras por grupo experimental. Difere significativamente do grupo controle, *P < 0,05 e **P < 0,01.

5. DISCUSSÃO

Os produtos naturais derivados de plantas têm sido, ao longo do tempo, fontes extremamente importantes de agentes medicinais e modelos de *design* para a síntese e semi-síntese de novas substâncias com atividade terapêutica (Balandrin, 1993), além de poderem ser utilizados como ferramentas farmacológicas (Dohadwalla, 1985).

Atualmente têm-se observado um grande consumo de plantas com propósitos terapêuticos sem ao menos serem avaliadas cientificamente. Somente com base nos resultados dos estudos dos efeitos farmacológicas e toxicológicas que será possível ter preparações a base de plantas medicinais com qualidade e segurança.

Os dados da literatura indicam a potencialidade da família Cucurbitaceae como fonte de substâncias biologicamente ativas. *W. ebracteata* forneceu cucurbitacinas com grande variabilidade estrutural, sendo que, a maioria destas ainda não foram estudadas do ponto de vista farmacológico. Os estudos existentes sobre cucurbitacinas revelam que se tratam de compostos com diversas atividades farmacológicas. No entanto, os dados são poucos conclusivos. A investigação sistemática sobre as possíveis atividades farmacológicas desta classe de compostos pode contribuir para a descoberta de novas substância ativas, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos ou ainda como ferramentas para o estudo do mecanismo de ação de novas drogas.

No presente trabalho foram avaliadas as propriedades antinociceptivas e antiinflamatórias das frações, frações purificadas e compostos isolados de *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) em modelos experimentais *in vivo* de nocicepção e inflamação bem como em modelos experimentais *in vitro* desenvolvidos com o auxílio de técnicas de biologia molecular.

Inicialmente foi avaliada a atividade analgésica do extrato bruto metanólico de *W. ebracteata* e suas frações no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Este teste foi introduzido por Siegmund *et al.* (1957) utilizando a fenilquinona, sendo padronizado posteriormente para outros agentes algogésicos tais como ácido acético, BK, ácido araquidônico, caolim entre outros (Whittle, 1964; Fujiyoshi *et al.*, 1986; Dubinsky *et al.*, 1987; Rates e Barros, 1994). Estes agentes químicos provocam uma irritação, cujo reflexo é o surgimento de contorções abdominais acompanhadas de extensão de uma das patas posteriores (Chau, 1989). Esses irritantes poderiam atuar indiretamente causando liberações de mediadores algicos endógenos, entre eles a BK, 5-HT, Hist e PGs (Whittle, 1964). A nocicepção seria então, o resultado da estimulação dos neurônios nociceptivos. O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é simples, reprodutivo, econômico, rápido e sensível às drogas analgésicas moderadas semelhantes ao AAS, aos antagonistas de receptores cininérgicos e aos analgésicos de ação central como, por exemplo, a morfina (Siegmund *et al.*, 1957; Vacher *et al.*, 1964; Steranka *et al.*, 1987). Apesar deste modelo ser desprovido de especificidade, existe uma estreita correlação com a potência exibida por drogas analgésicas neste modelo e suas eficácias clínicas (Siegmund *et al.*, 1957; Pong *et al.*, 1985; Dubinsky *et al.*, 1987). Assim, os resultados positivos deste modelo devem

ser analisados com cautela e em conjunto com os resultados de outros testes (Rates e Barros, 1994)

A administração por via i.p. do extrato bruto metanólico, assim como suas frações reduziram significativamente as contorções induzidas pelo ácido acético de maneira dose-dependente tendo como ordem de potência: F-CH₂Cl₂ > extrato bruto metanólico > F-AcOEt. O efeito inibitório também foi observado com o AAS, usado como controle positivo. A F - CH₂Cl₂ demonstrou rápido início do efeito analgésico (cerca de 30 min) sendo esta ação duradoura (mais de 4 h). As F-n-BuOH e F-H₂O na dose de 30 mg/kg, i.p., não reduziram significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Estes resultados demonstram que o efeito analgésico do extrato bruto metanólico é devido, ao menos em parte, aos constituintes presentes na F-CH₂Cl₂. Sendo assim, escolheu-se esta fração para dar continuidade à avaliação e estudos das atividades antinoceptiva e antiinflamatória.

Primeiramente avaliaram-se os resultados obtidos com a F-CH₂Cl₂ no teste de atividade geral. Os resultados demonstraram que a administração da F-CH₂Cl₂ não produziu alterações significativas dos parâmetros avaliados nas doses de 10mg/kg (i.p.) e 30 mg/kg (v.o.); no entanto dose superiores levaram a óbito os animais. Os valores estimados de DL₅₀ foram de 17,7 mg/kg por via i.p. e 62,4 mg/kg por v.o. Estes resultados indicam que a F-CH₂Cl₂ apresenta toxicidade aguda nas doses superiores àquelas estudadas nos testes farmacológicos. Estes resultados demonstram a necessidade eminente de uma rigorosa investigação da toxicidade de produtos fitoterápicos que possuem em suas formulações componentes (extratos, tinturas) a base de *W. ebracteata*.

Objetivando-se a melhor caracterização da atividade antinociceptiva da F-CH₂Cl₂, foi utilizado o teste da formalina em camundongos. Este modelo experimental foi originalmente descrito em gatos e ratos (Dubuisson e Dennis, 1977) e posteriormente adaptado para camundongos (Hunskaar *et al.*, 1985). O teste da formalina em camundongos consiste na injeção intraplantar da pata posterior direita do animal de uma solução aquosa diluída de formaldeído (formalina) com conseqüente processo nociceptivo caracterizado por lambidas, mordidas e espasmos vigorosos na pata injetada com o irritante. Inicialmente a reação dolorosa causada pela formalina foi observada na pata anterior do animal. No entanto, a resposta nociceptiva torna-se mais específica quando a injeção do irritante é efetuada na pata posterior, por ser raramente lambida em condições normais (Tjølsen *et al.*, 1992).

Sabe-se que a estimulação nociceptiva prolongada pode produzir a facilitação da transmissão dolorosa, podendo esta permanecer ativada além do período de estimulação (Coderre *et al.*, 1993). Este fenômeno é devido, além do aumento da sensibilidade das terminações nociceptivas periféricas (sensibilização periférica), ao aumento da excitabilidade dos neurônios dorsais medulares no SNC (sensibilização central) (Coderre e Melzack, 1992). Isto ocorre, após a injeção de formalina na região intraplantar de roedores, induzindo duas fases distintas de nocicepção relacionadas a dois estímulos distintos (Hunskaar *et al.*, 1985). A primeira fase aparece imediatamente após a injeção de formalina durante os 5 primeiros minutos, provavelmente devido à estimulação química das terminações aferentes nociceptivas. Esta fase (dor de origem neurogênica) (Haley *et al.*, 1990) é inibida por

antagonistas opióides, sendo também descrita a participação de vários mediadores químicos como o glutamato, a BK e do substância P (Hunskaar e Hole, 1987; Shibata *et al.*, 1989; Corrêa e Calixto, 1993). A Segunda fase (dor de origem inflamatória) aparece entre os 15 e 30 minutos após a injeção de formalina. Esta fase está relacionada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como Hist, 5-HT, BK e PGs, sendo então sensível aos AINEs e AIEs, além dos analgésicos opióides (Hunskaar e Hole, 1987).

O tratamento prévio dos animais com a F-CH₂Cl₂, tanto por via i.p. quanto por v.o., foi capaz de inibir as duas fases de nocicepção. No entanto a F-CH₂Cl₂ inibiu significativamente e de maneira dose-dependente, apenas a segunda fase (dor de origem inflamatória), assim como a indometacina, controle positivo. As doses da F-CH₂Cl₂ administradas aos animais não foram capazes de inibir por completo a primeira fase e demonstraram ser pouco ativas para inibir o edema formado associado à segunda fase. Com os resultados obtidos foi possível calcular as DI₅₀ para a segunda fase que foram para o tratamento por via i.p. de 1,65 (0,81 – 3,58) mg/kg e por v.o. de 6,45 (4,64 – 8,24) mg/kg. Estes resultados sugerem que F-CH₂Cl₂ demonstra uma atividade antinociceptiva, à medida que inibe a reatividade à dor observada na segunda fase de nocicepção induzida pela formalina. Por ser, esta fase, relacionada com os mediadores do processo inflamatório e inibida pelos AINEs, o efeito antinociceptivo demonstrado pela F-CH₂Cl₂ poderia estar relacionado com uma inibição dos mediadores do processo inflamatório. Isto porque, várias evidências experimentais demonstram que tanto a segunda fase de dor quanto o edema de pata causado pela formalina envolve a liberação de vários mediadores inflamatórios como as cininas, PGE₂, aminoácidos excitatórios e NO

(Manlberg e Yaksh, 1994, 1995; Haley *et al.*, 1990; Yamamoto e Yaksh, 1992; Coderre e Melzack, 1992; Corrêa e Calixto, 1993).

A atividade antinoceptiva da F-CH₂Cl₂ foi também estudada no teste do tail-flick introduzido por D'Amour e Smith (1941), um modelo sensível à modulação opióide. Ao contrário da morfina, analgésico opióide controle positivo do teste, a F-CH₂Cl₂ não alterou a reatividade dos camundongos ao estímulo térmico doloroso. Estes resultados em conjunto do teste de contorção abdominal e formalina, sugerem que os constituintes da F-CH₂Cl₂ não exerçam suas ações analgésica através das vias mediadas pelo sistema nervoso central.

Assim como os AINEs, a F-CH₂Cl₂ inibiu significativamente a reatividade da segunda fase de dor de origem inflamatória do teste da formalina. Sob este aspecto procurou-se avaliar a atividade antiedematogênica da F-CH₂Cl₂ usando primeiramente o modelo do edema de pata induzido pela carragenina em ratos. A carragenina, um polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Chondrus crispus*, é amplamente usada como agente flogístico. Neste modelo agudo de inflamação ocorre a liberação seqüencial de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como as aminas biogênicas (Hist e 5-HT), as cininas e os prostanóides (Di Rosa *et al.*, 1971) e é útil para identificar e caracterizar drogas como os AINEs e AIEs, mas este teste monitora somente mudanças como edema e eritema, não permitindo observar alterações na celularidade. Em ratos, por exemplo, a potência de AINEs, no teste do edema de pata induzido pela carragenina tem boa correspondência no homem (Freireich *et al.*, 1966). Recentemente, Seibert *et al.*, (1994) demonstraram que no teste do edema de pata induzido pela carragenina, a COX-2 foi expressa localmente em resposta aos estímulos pró inflamatórios e que a indução de COX-2 ARNm

coincidiu com a síntese de PGs e com o desenvolvimento do edema e hiperalgesia. O ARNm de COX-1 foi detectável na pata de ratos normais, mas sua expressão não mudou com o início do processo inflamatório.

O tratamento prévio dos animais tanto por via i.p. quanto por v.o. foi capaz de inibir significativamente de maneira dose - dependente o edema formado pela carragenina, à semelhança do controle positivo indometacina, um AINE que inibe a biossíntese das PGs (Vane, 1971; Flower *et al.*, 1972; Chan, *et al.*, 1995). O efeito antiedematogênico da F-CH₂Cl₂ foi também avaliado em animais adrenalectomizados, onde não se observaram alterações. Desta maneira, pode-se sugerir que os glicocorticóides endógenos não participam do efeito antiedematogênico da F-CH₂Cl₂.

Com o objetivo de investigar os princípios ativos com atividade antiedematogênica, no edema de pata induzido pela carragenina, a F-CH₂Cl₂ foi fracionada em 10 frações purificadas e testadas posteriormente. As frações purificadas FP-II e FP-IX, reduziram significativamente o edema formado pela carragenina. No entanto, somente a FP – III apresentou um perfil de inibição similar ao da F-CH₂Cl₂. Por tal motivo, escolheu-se a FP-III para dar continuidade aos estudos da atividade antiedematogênica. Deste modo pode-se sugerir que os princípios ativos responsáveis pela atividade antiedematogênica da F-CH₂Cl₂, poderiam estar presentes na FP – III. A partir da FP-III foram isolados e testados 3 compostos: cucurbitacina B, cucurbitacina E e diidrocurcurbitacina B descritos anteriormente na literatura (Farias *et al.*, 1993).

Os resultados demonstram que tanto a cucurbitacina B quanto a E foram eficazes em inibir o edema de pata induzido pela carragenina em ratos. No entanto,

a diidrocurbitacina B não foi capaz de exercer o mesmo efeito. Estes resultados sugerem que o efeito antiedematogênico da FP-III deve ser devido, principalmente, à presença das cucurbitacinas B e E.

Estes resultados demonstram que pequenas mudanças na estrutura química de um composto podem alterar significativamente suas atividades farmacológicas. Um fato relevante observado foi a relação entre a estrutura química dos compostos isolados e seus efeitos antiedematogênicos. A figura 8, mostra que as diferenças entre a cucurbitacina B e a cucurbitacina E são a presença de uma ligação - dupla entre os carbonos C1 e C2 (cucurbitacina E) e, conseqüentemente, a posição do grupamento hidroxila em C2. Com relação à diidrocurbitacina B, pode-se observar a ausência da ligação dupla entre os carbonos C23 e C24 da cadeia lateral do composto. Tal diferença foi suficiente para abolir o efeito farmacológico. Estes resultados sugerem que a cadeia lateral possui um importante papel para a atividade antiedematogênica. As mudanças estruturais no anel A parecem não interferir na atividade antiedematogênica, uma vez que não houve diferença significativa no efeito das cucurbitacina B e E sobre o edema de pata induzido pela carragenina.

Recentemente, foram realizados estudos sobre as relações quantitativas entre estrutura e atividade (QSARs) para as cucurbitacinas, no que diz respeito à atividade citotóxica *in vitro* e à toxicidade em animais, a partir de dados já descritos na literatura (Dang *et al.*, 1994). Os autores concluem que, no modelo estudado os elementos estruturais responsáveis pelas atividades citotóxicas e tóxicas não devem ser idênticos. Contudo, o número de compostos estudados e a sua variabilidade estrutural foram limitados. Nos últimos anos foram isoladas e identificadas diversas

novas estruturas, para as quais os dados toxicológicos e farmacológicos não existem ou são insuficientes (Matos *et al.*, 1991; Himeno *et al.*, 1992; 1993; Schenkel *et al.*, 1992; Achenbach *et al.*, 1993a; 1993b; 1995; Farias *et al.*, 1993; Stuppner e Müller, 1993; Valente *et al.*, 1993; 1994; Weckert *et al.*, 1993; Ahmad *et al.*, 1994).

Uma vez evidenciada as ações antinociceptivas no teste de contorção abdominal, na dor da segunda fase (dor de origem inflamatória) induzida pela formalina e antiedematogênica no teste do edema de pata induzido pela carragenina, a atividade da F-CH₂Cl₂ e seus produtos foi estudada na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

O modelo da pleurisia foi originalmente desenvolvido em ratos (Spector, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (Yamamoto *et al.*, 1975; Sedgwick e Willoughby, 1989). Com este modelo é possível avaliar simultaneamente o extravasamento plasmático e a migração celular na cavidade pleural induzidos por diversos agentes flogísticos (Capasso *et al.*, 1975; Brito, 1989; Lo *et al.*, 1982; Saleh *et al.*, 1996), além de avaliar também a concentração de muitos mediadores assim como a PGE₂, (Harada *et al.*, 1996) e enzimas como a COX-2 e a óxido nítrico sintase (NOS)(Tomlinson *et al.*, 1994).

A injeção de carragenina na cavidade pleural promove uma intensa reação inflamatória com formação de exsudato que contém principalmente neutrófilos e também mastócitos além de vários mediadores inflamatórios (Horakova *et al.*, 1980; Brito, 1989). Um número destes mediadores, incluindo Hist, 5-HT, BK, PGE₂, PGI₂, tromboxano A₂ (TXA₂) e LTB₄, tem sido detectado no exsudato pleural induzido pela carragenina além de ter sido determinada a cinética de suas produções na cavidade

pleural (Horakova *et al.*, 1980; Katori *et al.*, 1980; Harada *et al.*, 1982; Mikami e Miysaka, 1983; Raychaudhuri *et al.*, 1997).

A inflamação produzida na cavidade pleural é lenta e prolongada em comparação com aquela desenvolvida na pele. Isto se deve ao fato de haver diferenças na resposta ao mediador inflamatório, na drenagem linfática bem como nos tipos celulares envolvidos. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou que migram para o local do processo inflamatório (Doherty e Robison, 1976; Glatt *et al.*, 1979). Os leucócitos são conhecidos por serem uma das maiores fontes dos produtos da 5 – lipoxigenase, sendo relatado que eles liberam uma quantidade substancial de prostanoídes (Borgeat *et al.*, 1976; Hãnsch *et al.*, 1984). A PGE₂ causa vasodilatação e potencializa a exsudação plasmática induzida principalmente por diferentes mediadores (Ikeda *et al.*, 1975; Williams e Morley, 1973). Na pleurisia induzida pela carragenina em ratos foi observado um aumento paralelo no nível de PGE₂ bem como no nível da COX-2, mas não da COX-1, no exsudato pleural. Isto leva a crer que PGE₂ possui um importante papel na exsudação plasmática e que COX-2 pode estar envolvida na formação de PGE₂ no sítio inflamatório *in vivo* (Harada *et al.*, 1982, 1983, 1996). Os dados da literatura indicam claramente que a inflamação aguda não-específica provoca um aumento da geração de metabólitos dos ácido araquidônico pelos fagócitos locais na cavidade pleural (Dozen *et al.*, 1989; Mathieu *et al.*, 1990).

Neste trabalho, a injeção intrapleural de carragenina (1%) promoveu a migração celular, extravasamento plasmático (Figura 19 e 20)(Harada *et al.*, 1982; Katori e Majima, 1997) e aumento dos níveis de PGE₂ (Figura 21) (Mikami, *et al.*,

1983). Os resultados demonstraram que a F-CH₂Cl₂ promoveu uma atividade antiinflamatória quando administrada, tanto por via i.p. quanto por v.o., sendo capaz de diminuir o influxo celular e o extravasamento plasmático para a cavidade pleural, à semelhança do verificado com a indometacina e a dexametasona (Utsunomiya, *et al.*, 1994). O mesmo efeito foi observado quando os animais foram tratados com a FP-III ou cucurbitacina E. Além disto, observou-se que os níveis de PGE₂, avaliados no exsudato pleural diminuíram significativamente quando os animais foram tratados com a F-CH₂Cl₂ tanto por via i.p. quanto v.o., bem como com cucurbitacina B, administrada por via i.p. Este efeito inibitório também ocorreu com a indometacina, inibidor não seletivo das enzimas COX-1 e COX-2 (Mathieu *et al.*, 1990; Glaser *et al.*, 1995). Estes resultados indicam que a F-CH₂Cl₂ possui atividade antiinflamatória *in vivo*. Sugere-se ainda que o efeito antinocepcivo observado na segunda fase da dor (dor de origem inflamatória) induzida pela formalina e o efeito antiedematogênico observado no teste do edema de pata induzido pela carragenina estejam relacionados com diminuição dos níveis de PGE₂.

Tendo em vista que a F-CH₂Cl₂, bem como seus produtos causaram uma atividade antiinflamatória, provavelmente devido à inibição dos níveis de PGE₂, objetivou-se avaliar os possíveis efeitos da F-CH₂Cl₂ sobre a mucosa gástrica. Isto porque já é conhecido que os AINEs possuem toxicidade gastrintestinal (Bollini *et al.*, 1992). A Figura 21 demonstra que indometacina (inibidor não-seletivo de COX-1 e COX-2) promove o aparecimento de ulcerações na mucosa gástrica de ratos, devido à diminuição de PGs na mucosa gástrica (Waliace, 1995; Nakatsugi, *et al.*, 1996; Aly, 1997). Já a F-CH₂Cl₂ não foi capaz de produzir o mesmo efeito (Tabela 14, Figura 21).

Como já citado na introdução, recentes estudos têm mostrado a existência de duas isoformas de cicloxigenase (Rosen *et al.*, 1989; Masferrer *et al.*, 1990; Hla e Nielson, 1992). A primeira descrita COX-1 que é expressa constitutivamente e está distribuída em todos os tecidos (O'Banion *et al.*, 1991; O'Banion *et al.*, 1992). A outra isoenzima é a COX-2, que é induzível, isto é, pode ter sua expressão aumentada por mitógenos e condições que estimulam a proliferação, PGs entre outros (para revisão ver Pairet e Engelhardt, 1996). A inibição destas enzimas (COX-1 e COX-2) é o mecanismo de ação dos AINEs. Por conseguinte, seus efeitos colaterais são bem conhecidos, assim como toxicidade gastrointestinal (Bollini *et al.*, 1992; Scheiman, 1992; Robinson, 1997), mudanças na função renal (Wen *et al.*, 1992; Perneger *et al.*, 1995; Komhoff, 1997) entre outras, sendo que estes efeitos podem ser devidos à inibição da enzima constitutiva, COX-1 (DeWitt *et al.*, 1993; Vane e Botting, 1995; Vane e Botting, 1997). Os resultados obtidos até então sugerem que, além de apresentar uma atividade antiinflamatória, a F-CH₂Cl₂ provavelmente não interfere com a atividade da enzima COX-1, como observado *in vivo*, à semelhança do mecanismo de ação estabelecido para os inibidores seletivos de COX-2 (Donnelly e Hawkey, 1997)

Em busca de um mecanismo de ação que pudesse esclarecer os efeitos promovido pela F-CH₂Cl₂ e FP-III nos experimentos realizados *in vivo* foram, então, investigados os possíveis efeitos destas frações sobre a atividade da enzima COX-2, transfectadas em células COS-7, *in vitro*. Os resultados mostraram que a F-CH₂Cl₂, bem como a FP-III foram capazes de inibir a atividade enzimática da COX-2, nas doses estimadas a partir dos resultados obtidos com os experimentos *in vivo*.

A indometacina, assim como o composto NS-398, inibiram significativamente a atividade da COX-2 (Futaki *et al.*, 1994; Lora *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 1997).

Resultados preliminares sobre a atividade da enzima COX-1, demonstraram que tanto a F-CH₂Cl₂ quanto a FP-III não alteraram a atividade desta enzima (resultados ainda não publicados). Um outro possível mecanismo investigado, que pudesse explicar a diminuição dos níveis de PGE₂ no exsudato pleural dos animais tratados com F-CH₂Cl₂ foi a inibição da expressão da COX-2. Para testar esta hipótese, foram utilizadas células NIH 3T3, conhecidas por expressar ambas as enzimas (de Brum-Fernandes *et al.*, 1994; Crofford, 1997). Estas células foram pré-incubadas com a F-CH₂Cl₂ e depois estimuladas com interleucina-1 (IL-1). A F-CH₂Cl₂ não reduziu os níveis de COX-2 em células estimuladas com IL-1; já a dexametasona mostrou efeito inibitório significativo sobre a expressão enzimática (Masferrer *et al.*, 1990; O'Banion *et al.*, 1991; Hershman, 1992; O'Banion *et al.*, 1992a; O'Banion *et al.*, 1992b; de Brum-Fernandes *et al.*, 1994; Belvisi, *et al.*, 1997). Como esperado, os níveis de COX-1 permaneceram estáveis quando as células foram tratadas com dexametasona, controle positivo, ou com a F-CH₂Cl₂ (resultados ainda não publicados).

Em conclusão, os resultados apresentados neste trabalho, demonstraram que a F-CH₂Cl₂ e a FP - III possuem atividade antiinflamatória à medida que diminuem a migração celular e a exsudação. Este efeito poderia ser explicado pela diminuição dos níveis de PGE₂ no exsudato pleural, promovido pela F-CH₂Cl₂. Além disto, pode-se afirmar que ao menos em parte a cucurbitacina B e cucurbitacina E, os principais compostos da FP - III, participam deste efeito. Estes efeitos inibitórios foram, então confirmados com os resultados *in vitro*, onde se pode observar que

tanto a F-CH₂Cl₂ quanto a FP-III inibiram significativamente a atividade enzimática da COX-2, sugerindo-se assim que a atividade antiinflamatória da F-CH₂Cl₂ pode estar relacionada com a inibição direta da atividade da enzima COX-2. Outro fato interessante foi que a F-CH₂Cl₂ não exerceu um efeito ulcerogênico sobre a mucosa gástrica; isto pode sugerir que a F-CH₂Cl₂ não exerce seus efeitos sobre a COX-1. Este resultado foi preliminarmente confirmado pelos ensaios *in vitro*, onde a F-CH₂Cl₂ não foi capaz de inibir a atividade enzimática da COX-1.

No entanto, outros mecanismos poderiam estar envolvidos com o efeito inibitório sobre os níveis de PGE₂ exercido pela F-CH₂Cl₂, isto porque se trata de uma mistura de vários compostos.

Estudos estão em andamento em nossos laboratórios para esclarecer o(s) mecanismo(s) preciso(s) da atividade antiinflamatória dos produtos de *W. ebracteata*, bem como caracterizar os compostos responsáveis pelas ações encontradas. Finalmente, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para as doenças reumáticas no campo da farmacologia das prostaglandinas poderia levar a AINEs mais eficazes e seguros.

6. Sumário e conclusões

Wilbrandia ebracteata Cogn. é uma planta da América do Sul, conhecida popularmente no Brasil como “taiuiá”. Suas raízes são empregadas na medicina popular principalmente para o tratamento de doenças reumáticas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as atividades antinociceptiva e antiinflamatória de *W. ebracteata* em vários modelos de nocicepção e inflamação em camundongos e ratos (*in vivo*), bem como através de técnicas de biologia molecular (*in vitro*).

A avaliação da toxicidade aguda da fração mais ativa (F-CH₂Cl₂) demonstrou que nas doses de 10 mg/kg (i.p.) e 30 mg/kg (v.o.) em camundongos, não causaram alterações dos parâmetros analisados. Em doses mais altas, a F-CH₂Cl₂ provocou contorções abdominais, diarreia e morte. A DL₅₀ foi estimada em 17,7 mg/kg por via i.p. e 62,4 mg/kg por v.o.

No teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos, a administração por via i.p. do extrato bruto metanólico, da F-CH₂Cl₂ e da F-AcOEt, reduziu significativamente o número de contorções de maneira dose - dependente, onde os valores de DI₅₀ foram de 11,3(8,6-14,9); 5,6(3,2-9,9) e 16,2(12,3-21,3), respectivamente. As frações F-n-BuOH e F-H₂O não produziram alterações significativas. O pico máximo do efeito antinociceptivo da fração mais ativa (F -CH₂Cl₂; 10 mg/kg, i.p.), ocorreu 30 min após sua administração, persistindo este efeito por mais de 4h.

No teste da formalina em camundongos, a administração da F-CH₂Cl₂ (0,3 - 1 mg/kg) por via i.p ou (3 - 30 mg/kg) por v.o. não foi capaz de inibir por completo a primeira fase de nocicepção e o edema formado, mas inibiu significativamente de maneira dose-dependente, a segunda fase da dor. A ID₅₀ foi estimada em 1,65 (0,81-3,58)mg/kg i.p. e 6,45(4,64-8,24)mg/kg v.o.

No teste do *tail-flick*, a F-CH₂Cl₂ não alterou a reatividade dos animais ao estímulo térmico doloroso, ao contrário da morfina. Isto sugere que o efeito antinociceptivo da F-CH₂Cl₂ não esteja envolvido com o sistema nervoso central.

No teste do edema de pata induzido pela carragenina em ratos, a F-CH₂Cl₂ administrada por via i.p. (1 - 10 mg/kg) ou v.o. (3 - 30 mg/kg) reduziu significativamente o edema formado de maneira dose-dependente com uma ID₅₀ estimada em 1,86 (0,62-5,73)mg/kg por via i.p. e 15,84(10,3-23,9) mg/kg por v.o.

A adrenalectomia bilateral não alterou o efeito inibitório da F-CH₂Cl₂ sobre o edema de pata induzido pela carragenina em ratos, descartando a participação dos glicocorticóides endógenos.

O fracionamento da F-CH₂Cl₂ deu origem a 10 frações purificadas (FP). Apenas a FP - III (3 mg/kg, i.p.) reproduziu os efeitos antiedematogênicos observados com a F-CH₂Cl₂. Estes dados sugerem que, ao menos em parte, os princípios biologicamente ativos estejam presentes nesta fração.

Foram isolados da FP-III três compostos: cucurbitacina B, cucurbitacina E e diidrocurcubitacina B. Somente as cucurbitacinas B (1 mg/kg, i.p.) e E (1 mg/kg, i.p.) reduziram significativamente o edema de pata induzido pela carragenina em ratos. Levando em consideração as estruturas químicas destas substâncias, pode-se

sugerir que a ausência da ligação-dupla entre C23 e C24 na cadeia lateral da diidrocurbitacina B, foi suficiente para abolir o efeito antiedematogênico.

No modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, a administração da F-CH₂Cl₂ tanto por via i.p.(0,1-10 mg/kg) quanto por v.o.(3 – 30mg/kg), da FP-III (3,0 mg/kg, i.p.) ou cucurbitacina E (1,0 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o extravasamento plasmático e a migração celular, à semelhança da indometacina (5 mg/kg, i.p.) e dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.).

Outro parâmetro avaliado na pleurisia foi o nível de PGE₂. O pré-tratamento dos animais com a F-CH₂Cl₂ por via i.p. (0,001-10 mg/kg) ou por via v.o. (0,03 – 10 mg/kg) reduziu significativamente o nível de PGE₂ no exsudato, onde os valores estimados de DI₅₀ foram de 0,01 (0,002 – 0,09)mg/kg via i.p. e de 0,29 (0,05 – 1,45) por v.o. A administração de cucurbitacina B (0,1 mg/kg, i.p.) aos animais promoveu uma inibição significativa de 59,2% dos níveis de PGE₂. Este efeito inibitório também ocorreu quando os animais receberam previamente indometacina (10 mg/kg, i.p.), com inibição dos níveis de PGE₂ em 98,8%.

A F-CH₂Cl₂ não promoveu alterações visíveis na mucosa gástrica, ao contrário da indometacina, que induziu o aparecimento de ulcerações gástricas.

Foram realizados estudos *in vitro* demonstrando que tanto a F-CH₂Cl₂ quanto a FP-III, inibiram significativamente a atividade da enzima COX-2.

Concluindo, estes resultados indicam que a F-CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* possui atividades analgésica e antiinflamatória, confirmando as indicações populares de *W. ebracteata*. Pode-se sugerir que as atividades farmacológicas da F-CH₂Cl₂ de *W. ebracteata* são devidas à diminuição dos níveis de PGE₂ provavelmente, pela inibição da atividade enzimática COX-2. Além disso, estes

resultados sugerem que a FP-III e os compostos isolados cucurbitacina B e E, seriam responsáveis ao menos em parte, pelos efeitos analgésico e antiinflamatório desta planta.

Finalmente, os resultados deste trabalho sugerem que os compostos isolados possam servir de protótipos para o desenvolvimento de novas substâncias, bem como de novas abordagens terapêuticas dos processos inflamatórios, no campo da farmacologia das prostaglandinas podendo, desta maneira levar a drogas antiinflamatórias mais eficazes e seguras.

Parte destes resultados foram submetido e aceito para publicação:

Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Planta Medica (in press)*.

Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* Cogn:
Inhibition of PGE₂ – level in carrageenan-induced pleurisy in mice. (submetido para publicação)

7. Summary and conclusions

Wilbrandia ebracteata Cogn. is a South American plant that is popularly known in Brazil as "Taiuiá". Its roots are employed in folk medicine mainly for the treatment of rheumatic disorders. The aim of the present work was to evaluate both the antinociceptive and anti-inflammatory activities of the *W. ebracteata* in several nociception and inflammation models in mice and rats (*in vivo*), as well as through molecular biological techniques (*in vitro*).

The evaluation of the acute toxicity of the more active fraction (F-CH₂Cl₂) demonstrated that on the doses of 10 mg/kg (i.p.) and 30 mg/kg (p.o.) in mice it did not present changes in the analysed parameters. In higher doses the F-CH₂Cl₂ induced writhing, diarrhoea and death. It was possible to calculate, with these data, the LD₅₀ that was estimated in 17,7 mg/kg by i.p. route and 62,4 mg/kg p.o. route.

In the writhing test induced by acetic acid in mice, the administration by i.p. route of the methanolic crude extracts, F-CH₂Cl₂ and F-EtOAc, significantly reduced the number of writhing in the dose-dependent manner, and the values ID₅₀ were of 11,3(8,6-14,9); 5,6(3,2-9,9) and 16,2(12,3-21,3)mg/kg, respectively. The F-n-BuOH and F-H₂O fractions did not produce significant changes. The maximal antinociceptive effect of the most active fraction (F-CH₂Cl₂; 10 mg/kg, i.p.) occurred 30 min after its administration and it lasted about 4 hours.

In the formalin test in mice, the administration of F-CH₂Cl₂ by i.p or p.o. routes (0.3-1 mg/kg and 3-30 mg/kg, respectively), was not able to inhibit completely the

first phase of nociception and the formed edema, but it inhibited significantly in a dose-dependent mode the second phase pain. The ID_{50} calculated were 1,65 (0,81-3,58) mg/kg by i.p. route and 6,45(4,64-8,24)mg/kg by p.o. route.

In the *tail-flick* test, different from morphine, the F-CH₂Cl₂ did not alter the reactivity of the animals to dolorous thermal stimulus. This result suggests that the antinociceptive effect of F-CH₂Cl₂ is not involved with the central nervous system.

In the test of carrageenan induced edema in rats, the F-CH₂Cl₂, when administrated by i.p. route (1 –10 mg/kg) or p.o. (3 – 30mg/kg) route, significantly reduced in a dose-dependent mode formed edema. The ID_{50} was calculated in 1,86 (0,62-5,73) mg/kg by i.p. route and 15,84(10,3-23,9) by p.o. route.

The bilateral adrenalectomy did not alter the inhibitory effects of the F-CH₂Cl₂ under the carrageenan induced paw edema in rats, discarded the participation of endogenous glucocorticoids.

The fractioning of F-CH₂Cl₂ originated 10 purified fractions. Only FP-III (3 mg/kg, i.p.) reproduced the antiedematogenic effects observed in the F-CH₂Cl₂. This result suggests, at least in part, the presence of the biologically active principles, in this fraction.

Three compounds were isolated from the FP-III: cucurbitacin B, cucurbitacin E and dihydrocucurbitacin B. Only cucurbitacin B (1 mg/kg, i.p.) and E (1 mg/kg, p.o.) significantly reduced the carrageenan induced paw edema in rats. Considering the chemical structures of these compounds, it may be suggested that the absence of the double bond in the lateral chain of dihydrocucurbitacin B, was necessary to abolish the antiedematogenic effects.

In the pleurisy model induced by carrageenan in mice, the F-CH₂Cl₂ administration by i.p. (0.1 – 10 mg/kg) and p.o. (3 – 30 mg/kg) route of FP-III (3 mg/kg) and cucurbitacin B (1 mg/kg, i.p.) significantly reduced fluid leakage and cellular migration. These effects also occurred after administration of indomethacin (5 mg/kg, i.p.) and dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.).

Another parameter evaluated was the PGE₂ levels. The pre treatment of animals with F-CH₂Cl₂ by i.p. (0.001 – 10 mg/kg) and by p.o. (0.03-10 mg/kg) routes significantly reduced the PGE₂ levels in the exsudate. The values of the ID₅₀ were 0,01(0,002-0,09mg/kg, i.p.) and 0.29(0.05-1.45, p.o.). Cucurbitacin B (0.1 mg/kg, i.p.) induced a significantly inhibition (59.2%) of the PGE₂ levels. This same effect occurred when the animals were pre treated with indomethacin (10 mg/kg, i.p.), and this treatment significantly inhibited the PGE₂ levels in 98,8%.

The F-CH₂Cl₂ did not promote visible alteration in the gastric mucosa. However, indomethacin induced the appearing of gastric ulceration.

In vitro studying have shown that both the F-CH₂Cl₂ and FP-III significantly inhibited the enzymatic activity of the COX-2.

As a conclusion, these results suggest that the F-CH₂Cl₂ from *W. ebracteata* has analgesic and anti-inflammatory activities, which confirms its popular indications of the *W. ebracteata*. It may be suggested that the pharmacology activities of the F-CH₂Cl₂ from *W. ebracteata* are due to the decrease of PGE₂-levels probably by inhibition of the enzymatic activity of COX-2. Furthermore, these results also suggest that both FP-III and the isolated compounds (cucurbitacin B and E) could be, at least in part, responsible for the analgesic and anti-inflammatory effects of this plant.

Finally, the results suggest that the isolated compounds could be used as prototypes for the development of new therapeutic approaches to the process inflammatory, which could lead to more effective and safer NSAIDs in the field of the pharmacology of prostaglandins.

Part of these results were submitted and/or accepted for publication:

Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Planta Medica (in press)*.

Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* Cogn: Inhibition of PGE₂ – level in carrageenan-induced pleurisy in mice (submitted for publication)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. The complement system. In: Cellular and Molecular Immunology. Eds. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J., p. 260-281, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991.
- Achenbach, H., Horn, K., Dominguez, X. A., Rombold, C., Gomes, L., Elda, G. Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonora*. *Phytochemistry*, 33, 437-445, 1993a
- Achenbach, H., Horn, K., Waibel, R., Hefter-Buebl, U. 24-Acetylaminofevicordin D-glucosid, ein artefiziller Inhaltsstoff von *Fevillea cordifolia*? – Zur Reaktivität der Fevicordine. *Arch. Pharm.* 328, 481-485, 1995.
- Achenbach, H., Waibel, R., Hefter-Buebl, U., Constela, M. A. Constituent of tropical medicinal plants Constituents of *Fevillea cordifolia*: new norcucurbitacin and cucurbitacin glycosides. *J. Nat. Prod.* 56, 1506-1519, 1993b
- Ahmad, M. U., Huq, M. E., Sutrahara, R. K. Bitter principles of *Luffa echinata*. *Phytochemistry*, 36, 421-423, 1994.
- Albert, O., Djetcha, T., Lagrange, E., Aurousseau, M., Forgacs, P., Provost, J. e Tiberghien, R. Étude expérimentale de l'activité anthelminthique de quelques cucurbitacines. *Chim. Ther.* 5, 205-210, 1970.
- Almeida, F. R. C., Rao, V. S. N., Matos, M. E. O. Anti-inflammatory, antitumour and antifertility effects in rodents of two nor – cucurbitacin glucosides from *Wilbrandia* species, *Phytother. Res.* 6, 189 – 193, 1991.
- Almeida, F. R. C., Rao, V. S. N., Matos, M. E. O. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 22, 1397-1399, 1989.
- Aly, A. NSAID-inducer ulcer and its complication. *Nord Med* 112: 195-197, 1997.
- Andy, D., Urban, L., Dickenson, A. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 190-197, 1994.

- Balandrin, M. F., Kinghorn, A. D., Farnsworth, N. R. Plant-derived natural products in drug discovery and development. In: Kinghorn, A. D. e Balandrin, M., F. Human medicinal agents from plants. ACS symposium series, Library of Congress, p. 3-12, 1993.
- Bar-Nun, N.; Mayer, A. M. Cucurbitacins-repressors of induction of lactamase formation. *Phytochemistry*, 28, 1369-1371, 1989.
- Bauer, R.; Wagner, H. Cucurbitacin-containing drugs. Analysis and standardization of medicinal drugs and plant preparations by HPLC and other chromatographic methods, II. *Dtsch. Apoth.-Ztg.* 123, 1313 – 1321, 1983
- Bean, M. F., AnToun, M., Abramson, D., Chang, C., McLaughlin, J. L., e Cassady, J. M. Cucurbitacin B and isocucurbitacin B: cytotoxic components of *Helicteres isora*. *J. Nat. Prod.* 48, 500, 1985.
- Belvisi, M. G., Saunders, M. A., Haddad, el-B., Hirst, S. T., Yacoub, M. H., Barnes, P. J., Mitchell, J. A. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type. *Br J Pharmacol* 120: 910-916, 1997.
- Beutler, B.; Cerami, A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of same biological coin. *Nature*, 320: 584-588, 1986.
- Bevilacqua, M. P. Endothelial-leucocytes adhesion molecules. *Ann. Rev. Immunol.*, 11: 767-804, 1993.
- Bhagwat, S. S., Hamann, P. R., Still, W. C., Bunting, S., Fitzpatrick, F. A. Syntesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂ *Nature*, 315:511-513, 1985.
- Bollini, P., Rodrigues, L. A. G., Gutthann, S. P., Walker, A. M. The impact of research quality and study design on epidemiological estimates of the effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on upper gastrointestinal tract disease, *Arch. Intern. Med.* 152: 1289 – 1295, 1992
- Bonvalet, J. P., Pradelles, P., Farman, N. Segmetal synthesis and actions of prostaglandins along the nephron. *Am. J. Physiol.* 253: 377-387, 1987.

- Borgeat, P., M. Hamberg and B. Samuelsson. Transformation of arachidonic acid and homo-linoleic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes; Monohydroxy acids from novel lipoxygenase, *J. Biol. Chem.*, 251: 7816-7820, 1976.
- Bruneton, J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 2nd edn, pp.606-607. Technique et documentation Lavoisier, Paris, 1993.
- Budavari, S. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Ed. 1989. RahWay, NJ
- Burch, R. M. e Dehaas, C. A bradykinin antagonist inhibits carrageenin edema in rats. *Naunyn. Schmied. Arch. Pharmacol.*, 342: 189-193, 1990.
- Capasso F., Dunn, C. J., Yamamota, S., Willoughby, D. A, Giroud, J. P.,. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. *J. Pathol.* 116, 117 - 124. 1975.
- Carlini, E. A. "Screening" farmacológico de plantas brasileiras. *Rev. Bras. Biol.* 32: 265-274, 1972.
- Castro, J. M. *Purgativos indígenas do Brasil*. Rio de Janeiro: Moreira e Maximiniano, 1879.
- Cavanaugh, P. F. Jr, McDonald, J. S., Pavelic, L., Limardi, R. J., Gluckman, J. L., Pavelic, Z. P. Immunohistochemical localization of prostaglandin H synthase isoenzyme proteins in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Immunopharmacology*. 3: 109-119, 1995.
- Chan, C., Boyce, S., Brideau, C., Ford-hutchinson, A. W., Gordon, R., Guay, D., Hill, R. G., Li, C., Mancini, J., Penneton, M., Prasit, P., Rasori, R., Riendeau, D., Roy, P., Tagari, P., Vickers, P., Wong, E., Rodger, W. Pharmacology of a Selective Cyclooxygenase – 2 Inhibitor, L – 745, 337: A novel Nonsteroidal Anti-inflammatory Agent with an Ulcerogenic Sparing Effects in Rat and Nonhuman Primate Stomach. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 1531 – 1537, 1995.
- Chau, T. T. Analgesic testing in animals models. *Pharmacol. Meth. Control Inflamm.*, 5,195-212, 1989.

- Coderre, T. J., Katz, J., Vaccarino, A. L., Melzack, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*, 52: 259-285, 1993.
- Coderre, T. J., Melzack, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neurosci.* 12: 3665-3670, 1992.
- Collier, H. O. J., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., Schneider, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 32: 295-310, 1968.
- Corrêa, C. R., Calixto, J. B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 110: 193-198, 1993.
- Cramer, E. B. Cell biology of phagocyte migration from the bone marrow, out of the bloodstream, and across organ epithelia. In: *Inflammation: Basic Principles and clinical correlates*. Eds. Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R., p. 341-349, New York, Raven Press, Ltda, 1992.
- Crofford, L. J. COX-1 e COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol.* 49: 15-19; 1997.
- Crofford, L. J., Wilder, R. L., Ritmaski, A. P., Hajime, S., Remmers, E. F., Epps, H. R. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. *J. Clin. Invest.* 93: 1095 - 1101. 1994.
- D'Amour, F. E. e Smith, J. A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 72: 74-79, 1941.
- Dang, G. V., Rode, B. M., Stuppner, H. Quantitative electronic structure-activity relationship (QESAR) of natural cytotoxic compounds: Maytansinoids, quanssinoids and cucurbitacins. *Eur. J. Pharmac. Sciences.* 2: 331-350, 1994.
- Davidge, S. T., Baker, P. N., Mclaughlin, M. K., Roberts, J. M. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. *Circ. Res.*, 77: 274-283, 1995.
- Davies, A., Simmons, D. I., Hale, G., Harrison, R. A., Tighe, H., Lachmann, P. J., Waldmann, H. The complement system in humoral immunity. In: *Immunobiology*,

- the immune system in health and disease. Eds. Janeway, C. A., Travers, P., 8-22, New York: Garland Publishing Inc., 1994.
- De Brito, F. D. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In. Liss, A. A. R. (Ed.), *Pharmacological Methods in the Control of inflammation*. Degenham: Rhone Poulenc LTD., pp.173 – 228, 1989
- de Brum-Fernandes, A.J., Laporte, S., Heroux, S., Lora, M., Patry, C., Ménard, H.-A., Dumais, R., Leduc, R. Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 955-960, 1994.
- De Witt, D. L., Meade, E. A., Smith, W. L. PGH synthase isoenzyme selectivity: The potential for safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Amer. J. Med.* 95 (suppl 2A): 40S. 1993.
- Di Rosa, M., Giroud, J. P., Willoughby, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Path.* 104: 15-29, 1971.
- Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M. New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev. Infec. Dis.*, 10: 168-189, 1988.
- Dinarello, C. A., Cannon, J., G., Mancilla, J., Bishai, I., Lees, J., Cocceani, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E₂ in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res.* 562: 199-206, 1991.
- Dohadwalla, A. N. Natural product pharmacology: strategies in search of leads for new drug designs. *TIPS* 6:49-53, 1985.
- Doherty, N. S., Robson, B. V. Some biological and pharmacological properties of inflammatory exsudates. *J. Pharm. Pharmacol.*, 28: 856-864, 1976.
- Donnelly, M. T., Hawkey, C. J. Review article: COX-II inhibitors – a new generation of safer NSAIDs. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11(2)227-236, 1997.
- Dozen, M., Yamaki, K., Oh-ishi, S. Captopril uncovers kinin-dependent release of arachidonic acid metabolites in carrageenan - induced rat pleurisy. *Jpn. J. Pharmacol.* 51, 101-105, 1989.
- Dray, A. e Bevan, S. Inflammation and hiperalgesia: Highlighting the tea effort. *Trens Pharmacol. Sci.*, 14: 287-290, 1993.

- Dubinsky, B., Gebre-Mariam, S., Capetole, R. J., Rosenthale, M. E. The antialgesic drugs: human therapeutic correlates of their potency in laboratory animal models of hyperalgesia. *Agents and Actions* 20: 50-60, 1987.
- Dubuisson, D., Dennis, S. G., The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morfine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4: 161-174, 1977.
- Falope, M. O., Takeda, Y., Yamashita, H., Okabe, H., e Yamauchi, T. New cucurbitacine triterpenoids from *Momordica charantia*. *J. Nat. Prod.* 53, 1491-1497, 1990.
- Farias, M. R., Cucurbitacine aus *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (Cucurbitaceae). Bonn: Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn, 1991. Dissertação (Doutorado em Farmácia).
- Farias, M. R., Schenkel, E. P., Mayer, R., Rücker, G. Cucurbitacins as constituentes of *Wilbrandia ebracteata*. *Planta Med.* 59, 272 - 275. 1993.
- Farias, M. R; Schenkel, E. P. Caracterização de cucurbitacinas em espécies vegetais conhecidas como taiuiá. *Ciência e Cultura.* 39: 970-973, 1987.
- Feng, L., Sun, W., Xia, Y., Tang, W. W., Chanmugam, P., Soyoola, E., Wilson, C. B., Hwang, D. Cloning two isoform of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 361-368, 1993.
- Ferreira, S. H., Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesis. *Nature New Biology* 240: 200-203, 1972.
- Flower, R., Glyglewski, R., herbaczyska-Cedro, K., Vane, J. R. Effects of antiinflammatory drugs on prostaglandins biosynthesis. *Nature New Biology*, 238: 104-106, 1972.
- Fontone, J. C. Mechanisms of chemotactic factors stimulation of polymorphonuclear leucocytes modulation by prostaglandins. In: *Inflammatory Mediators*. Eds. Higgs, G. A., Williams, T. J., p. 127-148, New York: Macmillan 1985.
- Freireich, E. J., Gehan, E. A., Rall, D. P., Schimidt, L. H. Quantitative comparison of toxicity of cancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. *Cancer chemother. Resp.*, 50: 219-244, 1966.

- Fujiyoshi, T., Dozen, M., Iida, H., Ikeda, Kenro, Hayashi, I., Oh-Ishi, S. Demonstration of kinin-release in the peritoneal exudate of kaolin-induced writhing in mice, *Jap. J. Pharmacol.* 53: 255-257, 1986.
- Furnsworth, N. R., Soejarto, D. D. Global importance of medicinal plants. In: Akerele, O., Heywood, V., Synge, H. Conservation of medicinal plants. Cambridge: Cambridge University Press. p.25-51, 1991.
- Futaki, N., Takahashi, S., Yokoyama, M., Arai, I., Higuchi, S., Ottomo, S. NS – 398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* 47: 55 - 59. 1994.
- Gao, W., Ling, J., Zhong, X., Lui, W., Zhang, R., Yang, H., Cao, H., Zhang, Z. *FEBS Lett.* 347, 257-260, 1994.
- Glaser, K., Sung, M., O'Neill, K., Belfast, M., Hartman, D., Carlson, R., Kreft, A., Kubrak, D., Hsiao, C., Weichman, B. Etodolac selectively inhibits human prostaglandin G/H synthase 2 (PGHS – 2) versus human PGHS – 1. *Eur. J. Pharmacol.* 281, 107 – 111, 1995.
- Glatt, M., Dieppe, P., Willoughby, D. A. Crystal-induced inflammation, enzyme release and the effects of drugs in the pleural space. *J. Rheumatol.*, 6: 251-258, 1979.
- Gonen, L., Viterbo, A., Frank, C., Staples, R. C. e Mayer, A. M. Effect of cucurbitacins on mRNA coding for laccase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 42(2) 321-324, 1996.
- Goodwin, S. D.; Glenny, R. W. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated pulmonary infiltrates with eosinophilia. *Arch. Inter. Med.* 152: 1521 - 1524. 1992
- Grünwald, J. The European phytomedicines market figures, trends, analyses. *HerbalGram*, 34: 60-65, 1995.
- Guha, J.; Pen, S. P. Antigibbellerins of the Cucurbitaceae. *Nature New Biol.* 244, 223-224, 1973.

- Haaven, C. e Vermes, I. (Eds). Apoptosis and inflammation. In: Mediators of inflammation. Eds. Haaven, C., Vermes, I., 4: 5-15, Oxford, London: Rapid Communication of Oxford Ltda, 1995.
- Haley, J. E., Sullivan, A. F., Dickenson, A. H. evidence for spinal *N*-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res.* 518: 218-226, 1990.
- Hamato, N., Koshiba, T., Phan, T-N., tatsumi, Y., Nakamura, D., Takano, R., Hayashi, K., Hong, Y. M., Hara, S. Trypsin and elastase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* LINN.) Seeds: purification, Amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors. *J. Biochem.* 117: 432-437, 1995.
- Han, T.; Ma, H.; Chao, Y.; Chou, L. Preventive effects of cucurbitacin B on experimental hepatitis and cirrhosis. *Chung-hua I Hsueh Tsa Chih* 59, 206-209, 1979.
- Hänsch, G . M., Seitz, M., Martinotti, G., Betz, M., Rauterberg, E. W., and Gemsa, D., 1984. Macrophages release arachidonic acid, prostaglandin E_{2α}, and thromboxane in response to late complement components. *J. Immunol.* 133: 2145 – 2150, 1984.
- Harada, Y., Hatanaka, K., Kawamura, M., Saito, M., Ogino, M., Majima, M., Ohno, T., Ogino, K., Yamoto, K., Taketani, Y., Yamoto, S., Katori, M. Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E₂ formation in rat carrageenan-induced pleurisy. *Prostaglandins* 51, 19-33. 1996.
- Harada, Y., Hatanaka, K., Saito, M. Cyclooxygenase-2 in the rat carrageenin-induced pleurisy [Abstract]. *Jpn J Pharmacol* 67: S43-4, 1995.
- Harada, Y., Tanaka, K., Uchida, Y. Changes in the levels of prostaglandins and thromboxane and their roles in the accumulation of exudate in rat carrageenan – induced pleurisy. – A profile analysis using gas chromatography – mass spectrometry. *Prostaglandins* 23: 881-895, 1982.
- Harada, Y., Tanaka, K., Yamachita, K., Ishibashi, M., Miyazaki, H., Katori, M. The anti-inflammatory mechanism of MK – 447 in rat carrageenan – induced pleurisy. *Prostaglandins* 26: 79-90, 1983.
- Hayashi, O. Prostaglandin D₂ and Sleep. *Ann N Y Acad Sci* 559: 374-381, 1989.

- Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflazen*. Basel: Birkhauser, p. 363-375, 1989.
- Herchman, H. R. Characterisation of a gene encoding a second prostaglandin synthase/cyclooxygenase (PGS/COX), whose message and protein are induced by mitogens and inhibited by glucocorticoids. *The 8th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds*. Montreal. CANADA, 26-31 July. Abstract No. 302, pp. 79, 1992.
- Himeno, E., Nagao, T., Honda, J., Okabe, H., Irino, N., Nakasumi, T. Structure of Cayaponosides A, B, C and D, Glucosides of New Nor-cucurbitacins in the roots of *Cayaponia tayuya*. *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2885-2887, 1992.
- Himeno, E., Nagao, T., Honda, J., Okabe, H., Irino, N., Nakasumi, T. Structure of New Non-aromatized nor-cucurbitacin glucosides in the roots of *Cayaponia Tayuya*. *Chem. Pharm. Bull.*, 41, 986-988, 1993.
- Hla, T., Nielson, K. Human cyclooxygenase – 2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 16, 7384 - 7388. 1992.
- Hla, T., Ristimäki, A., Appleby, S., Barriocanal, J. G. Cyclooxygenase gene expression in inflammation and angiogenesis. *Ann NY Acad Sci*. 696: 197-204, 1993.
- Hoehne , F. C. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas*. São Paulo: Graphicars, p. 290-293, 1939.
- Hoehne , F. C. *Vegetais antihelmínticos*. São Paulo: Weisflog, 1920.
- Horakova, Z., Bayer, B. M., Almeida, A. P., Beaven, M. A. Evidence that histamine does not participate in carrageenan-induced pleurisy in rat. *Eur. J. Pharmacol*, 62, 17 – 25. 1980.
- Hu, R., Peng, Y., Chen, B., Chen, Y., e Hou, X. Study on Tian Gua di(*Cucumis melo* L.) na antihepatitis chinese. Preparation and assay of Gua Di Su e cucurbitacins B e E. *Zhongcaoyao*, 13, 445-447, 1982.
- Hua, X. Y. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relaxation to peripheral function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol. Scand*. 551: 1-44, 1986.
- Hunskar, S., Fasmer, O. B. e Hole, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesic. *J. Neurosci. Meth*. 14: 69-76, 1985.

- Hunnskaar, S., Hole, K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30:103 – 114, 1987.
- Ichikawa, S., Goto, Y., Uchino, S., Kaltreider, B., Goetzl, E. J., Sreedharan, S. P. Changes in adhesion molecule expression during distinct patterns of immune cell migration in the inflamed lung. *Arch. Histol. Cytol.* 59: 443-452, 1996.
- Ikeda, K., Tanaka, K., Katori, M. Potentiation of bradykinin – induced vascular permeability increase by prostaglandin E₂ and arachidonic acid in rabbit skin, *Prostaglandins* 10: 747-758, 1975.
- International Medical Statistics (1994). In. Eaves, M. The European Experience. Symposium "Botanicals: A role in U. S. Health care?" Washington, Dec. 1994.
- Katori, M., Harada, Y., Tanaka, K., Miyazaki, H., Ishibasshi, M., Yamashita, Y., Changes of prostaglandin and thromboxane levels in pleural fluid of rat carrageenin-induced pleurisy. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 8: 1733 – 1737, 1980.
- Katori, M., Majima, M. Multiple roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 109: 247-258, 1997.
- Klein, V. L. G. Cucurbitaceae do estado do Rio de Janeiro subtribo *Melothriinae* E. G. O. Muell et F. Pax. Rio de Janeiro: Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas-Botânicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1990. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Botânica).
- Komhoff, M., Grone, H. J., Klein, T., Seyberth, H. W., Nusing, R. M. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am. J. Physiol.* 272: F460-F468, 1997.
- Koster, R., Anderson, M., De Beer, E. J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18: 412, 1959.
- Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W., Hershman, H. R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* 266: 12866 - 12872. 1991.

- Larsen, J. J. e Arnt, J. Reduction in locomotor activity of arthritic rats as parameter for chronic pain: effect of morphine, acetylsalicylic acid and citaprolam. *Acta pharmacol. et toxicol.* 57: 345-351, 1985.
- Lavie, D. e Glotter, E. The cucurbitacines, a group of tetracyclic triterpenes. *Fortschr. Chem. Org. Nat.* 29: 307-362, 1971.
- Le Men, F., Buffard, G., Provost, J., Tiberghien, R., Forgacs, P., Albert, O., Lagrange, E., Aourousseau, M. relation entre la structure de quelques cucurbitacines, leur toxicité et leur activité laxative. *Chim. Théor.* 6. 459-465, 1969.
- Leme, J. G., Hamamura, L., Leite, M. P., Rocha e Silva, M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. *Br. J. Pharmacol.*, 48: 88-96, 1973.
- Ling, M. H.; Qi, H. Y.; Chi, C. W. Protein, cDNA, and genomic DNA sequences of the towel gourd trypsin inhibitor. A squash family inhibitor. *J. Biol. Chem.* 268: 810 – 814, 1993
- Lo, T. N., Almeida, A. P., Braven, M. A. Dexam and carrageenan evoke different inflammation in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 221, 261 – 267, 1982.
- Lora, M., Morisset, S., Ménard, H.-A., Leduc, R., de Brum-Fernandes, A.J., Expression of recombinant human cyclooxygenase isoenzymes in transfected COS-7 cells in vitro and inhibition by tenoxicam, indomethacin and aspirin. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 56,361-367, 1997.
- Maciel, F. M. B., Lora, M. de Brum-Fernandes, A. J. Prostaglandins: new approaches for an old problem. *Rev. Bras. Reumatol.* 35: 231-234, 1995.
- Magistretti, M. J., Conti, M., Cristoni, A. Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*. *Arzneim. Forsch. Drug Res.*38: 686-690, 1988.
- Malberg, A. B., Yaksh, T. L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal antiinflammatory agents on the formalin test in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 136 – 146, 1992.

- Malone, M. H. Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. In: Wagner, H. Wolff, P. New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity. Berlin, Springer, 1977.
- Malone, M. H. The pharmacological evaluation of natural products general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *J. Ethnopharmacol.* 8: 127-147. 1983.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. *Molecular Cloning – a laboratory manual.* Nem York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.
- Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C., Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 3228 -3232. 1994.
- Masferrer, J.L., Zweifel, B. S., Seibert, K., Needleman, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J. Clin. Invest.* 86, 1375 - 1379. 1990.
- Mathieu, J., Tissot, M., Nobile, D., Florentin, I., Kergonou, J. F., Giroud, J. P. Local and systemic effects of an acute inflammation on eicosanoid generation capacity of polymorphonuclear cells and macrophages. *Int. J. Exp. Pathol.* 71, 603-616, 1990.
- Matos, M. E. O., Machado, M. I. L., Craveiro, A. A. Matos, F. J. A., Braz-Filho, R., Nor-Cucurbitacin Glucosides from *Wilbrandia* species. *Phytochemistry*, 30, 1020-1023, 1991.
- Meade, E. A., Smith, W. L., DeWitt, D. L. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase(cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 268: 6610-6614, 1993.
- Mikami, T., Mysaka, K. Effects of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin – induced pleurisy. *Eur J Pharmacol.*, 95, 1 – 12. 1983.
- Milton A. S. Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. *Ann. NY Acad. Sci.* 559: 392-410, 1989.

- Ming, L. C., Coleta de plantas medicinais, In: Di Stase, L. C., Plantas Mediciniais: arte e ciência. Um guia de estudos interdisciplinar. Editora da Universidade Estadual Paulista, p. 69-86, 1996.
- Miró, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. *Phytother. Res.* 9, 159 – 168, 1995
- Moerman, D. E. The medicinal Flora of Native North America: an Analysis. *J. Ethnopharmacol.*, 31: 1-42, 1991.
- Morita, I., Schindler, M, Regier, M. K., Otto, J. C., Hori, T., DeWitt, D. L., Smith, W. L. Different intracellular localization for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J. Biol Chem.* 18: 10902-10908, 1995.
- Murray, C. W., Porreca, F., e Cowan, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. *J. Pharmacol. Methods* 20: 175-186, 1988.
- Nakatsugi, S. Terada, N., Yoshimura, T., Horie, Y., Furukawa, M. Effects of nimesulide, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor, on carrageenan-induced pleurisy and stress-induced gastric lesions in rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 55:395-402, 1996.
- NG, T. B., Chan, W. Y., Yeung, H. W. The ribosome-inactivating, antiproliferative and teratogenic activities and immunoreactivities of a protein from seeds of *Luffa aegyptiaca* (cucurbitaceae). *Gen. Pharmacol.* 24, 655-658, 1993a
- NG, T. B., Shaw, P. C., Yeung, H. W, Ho, W. K. K., Immunological relatedness of ribosome-inactivating proteins from the cucurbitaceae family. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31, 447-453, 1993b
- O'Banion, M. K., Sadowski, H. B., Winn, V., Young D. A. A serum and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J. Biol. Chem.* 266, 23261 - 23267. 1991
- O'Banion, M. K., Winn V. D., Young, D. A., *gIPGHS*: a second cyclooxygenase gene responsive to glucocorticoids, growth factors and cytokines. The 8th International Conference of prostaglandins and related compounds, Montreal, Canada, 26-31 July, Abstract No. 305, pp. 79, 1992b.

- O'Banion, M. K., Winn, V., Young, D. A. cDNA Cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammation Cyclooxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4888 - 4892. 1992a
- O'Neil, G. P. e Ford-Hutchinson, A. W. Expression of mRNA for Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. FEBS Lett. 330, 156-160, 1993.
- Okabe, H., Miyahara, Y., e Yamauchi, T. Studies on the constituents of *Momordica charantia*L. III. Characterization of new cucurbitacin lycosides of the immature fruits. Structures of momordicosides G, F₁, F₂ e I. Chem. Pharm. Bull. 30, 3977 – 3986, 1982.
- Okia, S. E., Jumblatt, J. E. Prejunctional inhibitory effects of prostanoids on sympathetic neurotransmission in the rabbit iris-ciliary body. J. Pharmacol. Exp. Ther. 255: 11-16, 1990.
- Otto, J. C. e Smith, W. L. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. J. Lipid Mediators Cell Signalling 12: 139-156, 1995.
- Ouellet, M. e Percival, M. D. Effects of inhibitor time-dependency and selectivity towards cyclooxygenase isoforms. Biochem J. 306: 247-251, 1995.
- Pairet, M. e Engelhardt, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. Fundam. Clin. Pharmacol. 10:1-15, 1996.
- Peckolt, T., Plantas medicinais e úteis do Brasil. Rev. Flora Med., v. 3, n.8, p.479-482, 1937.
- Pereira, A. M. C. B., Farias, M. R., Vargas, V. M. F. Study of mutagenic activity of extracts of the plant *Wilbrandia ebracteata*. Phyt. Res. 10: 512-516, 1996.
- Perneger, T. V., Whelton, P. K., Klag, M. J. Risk of kidney failure associated with the use of acetaminophem, aspirin, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. N. Eng. J. Med. 331: 1675 - 1679. 1995.
- Pezzuto, J. M., Plant-Derived Anticancer Agents. Biochemical Pharmacology, 53, 121-133, 1997.
- Pio Corrêa. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, 6v. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1926 – 1978.

- Plotkin, M. J. Traditional Knowledge of medicinal plants: the search for new jungle medicines. In: Akerele, O., Heywood, V., Syngé, H. Conservation of medicinal plants. Cambridge: Cambridge University Press. p.53-64, 1991.
- Pong, S. F., Demuth, S. M., Kinney, C. M., Deegan, P. Prediction of human analgesic dosages of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) from analgesis ED₅₀ values in mice. Arch. Int. Pharmacodyn. 273: 212-220, 1985.
- Raisz, L. G., Voznesensky, O. S., Alander, C. B, Kawaguchi, H., Pilbeam, C. C. Auto-amplification of inducible prostaglandin synthase (cyclooxygenase) in osteoblastic MC3T3-E1 and PY1A cells. J. Bone Min. Res. 8, S161. 1993.
- Rates, S. M. K., Barros, H. M. T. Modelos animais para a avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. Rev. Bras. Farm. 75(2): 31-34, 1994.
- Raychaudhuri, A., Chertock, h., Chovan, J., Jones, L. S., Kimble, E. F., Kowalski, T. J., Peppard, J., White, D. H., Satoh, Y., Roland, D. Inhibition of LTB₄ biosynthesis in situ by CGS 23885, a potente 5-lipoxygenase inhibitor, correlates with its pleural fluid concentration in an experimental induced rat pleurisy model. Nuan. Schmied. Arch. Pharmacol. 4: 470-474, 1997.
- Reeves, J. J. Bunce, K. T., Sheldrick, R. L. G., Stables, E. Evidence for the PGE₂ receptor subtype mediating inhibition of acid secretion in the rat. Br J. Pharmacol 95: 805P. 1988.
- Resnick, R., Halliday, D. Física. 4 ed. Rio de Janeiro Ed. Livros técnicos e científicos, 1985.
- Ríos, J.L., Giner, R. M., Jiménez, M.J. A study on the anti-inflammatory activity of *Cayaponia tayuya* root. Fitoterapia. 61, 275 – 278. 1990.
- Ristamaki, A., Garfinkel, S., Wessendorf, J., Maciag, T., Hla, T., Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. J. Biol. Chem. 269: 11769 - 11775. 1994.
- Robinson, D. R. Regulation of prostaglandin synthesis by anti-inflammatory drugs. J Rheumatol Suppl. 47: 32-39, 1997.
- Rocha e Silva, M. Fundamentos da Farmacologia e suas aplicações à terapeutica. São Paulo, Edart, v.1, 1973

- Rocha e Silva, M. O. Brief history of inflammation In: Handbook of experimental pharmacology. Eds. Vane, J. R., Ferreira, S. H., p. 6-25, New York: Springer-Verlag, 1978.
- Rosen, G. D., Birkenmeier, T. M., Raz, A., Holtzman, M. J. Identification of cyclooxygenase-related gene and its potential role in prostaglandin formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164:1358 - 1365. 1989
- Saleh, T.S.F., Calixto, J.B. and Medeiros, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy, *Br. J. Pharmacol.*, 118, 811 – 819, 1996.
- Salvemini, D., Misko, T. P., Masferer, J., Seibert, K., Currie, M. G., Needleman, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 7240-7244, 1993.
- Santos, R. I., Santos, M. A., Schenkel, E. P. Analysis of the plants drug *Wilbrandia ebracteata* (Cogn.) Cogn. *Inter J Pharmacogn.* 34(4) 300-302, 1996.
- Scheiman J. M. Pathogenesis of gastroduodenal injury due to nonsteroidal anti-inflammatory drugs: implication for prevention and therapy. *Semin. Rheum. dis* 21: 201 - 210. 1992
- Schenkel, E. P., Farias, M. R., Mayer, R., Breitmaier, E., Rücker, G. Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. *Phytochemistry* 31, 1329-1333 1992.
- Schindler, S. S. Catalogue of brazilian medicinal plants. Rio de Janeiro: Moreira e Maximiliano, 1884.
- Scott, D. T., Lam, F. Y. e Ferrell, W. R. Acute Joint Inflammation-Mechanisms and Mediators. *Gen. Pharmacol.* 25(7), 1285-1296, 1994.
- Sedgwick, A. D., Willoughby, D. A. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: *Textbook of Immunopharmacology*. Eds. Dale, M. M., Foreman, J. C., p. 253-261, Edinburgh: Blackwell Scientific publications, 1989.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12013 - 12017. 1994

- Sharma, G. C.; Hall, C. V. Cucurbitacin B and total sugar inheritance in *Cucurbita pepo* related to spotted cucumber beetle feeding. *J. Am. soc. Hort. Sci.* 96, 750-754, 1971b.
- Sharma, G. C.; Hall, C. V. Influence of cucurbitacins, sugars, and fatty acids on cucurbit susceptibility to spotted cucumber beetle. *J. Am. soc. Hort. Sci.* 96, 675-680, 1971a.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response: *Pain* 38: 347-352, 1989.
- Sibille, Y. e Reynolds, H. Macrophages and polimorphonucleares neutrophils in lung defense and injury. *Am. Jer. Resp. Dis.*, 141: 471-501, 1990
- Siegmund, E., Cadmus, R., Lu, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesic. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95: 729-731, 1957.
- Silva, J. R. M. Plantas medicinais e industriais, Rio de Janeiro: Almeida Marques, 1923.
- Silveira, U. A. Terapêutica brasileira. 3ed. Rio de Janeiro: Garnier, 1889.
- Simões, C. M. O., Mentz, L. A., Schenkel, E. P., Irgang, B. E., Stehmann, J. R. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. Ed. Da Universidade/UFRGS. Porto Alegre, 1986.
- Simon, L. S., Nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicity. *Curr Op Rheum.* 5: 265-275, 1993.
- Smith, W. L. e DeWitt, D. L. Differential interaction of prostaglandin endoperoxide synthases with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current Opin Invest Drugs.* 3: 1-11, 1994.
- Sonnenburg, W. Z., Zhu, J. H., Smith, W. L. Prostaglandin E receptor coupled to a pertussis-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J. Biol. Chem.* 265: 8479-8483, 1990.
- Spector, W. G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *J. Pathol. Bact.*, 72: 367-380, 1956.
- Sternaka, I. R., DeHaas, C. J., Vavrek, R. J., Stewart, J. M., Enna, S. J., Snyder, S. H., Antinociceptive effects of bradykinin antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 136: 261-262, 1987.

- Stokes, J. B., Integrated actions of renal medullary prostaglandins in the control of water excretion. *Am J Physiol.* 240; 471-480, 1981.
- Stuppner, H., Müller, E. P. Cucurbitacins with unusual side chains from *Picrohiza kurroa*. *Phytochemistry*, 33: 1139-1145, 1993.
- Takarashi, Y., Taketani, Y., Endo, T., Yamamoto, S., Kumegawa, M. Studies on the induction of cyclooxygenase isoenzymes by various prostaglandins in mouse osteoblastic cell line with reference to signal transduction pathway. *Biochem. Biophys. Acta* 13: 217 – 224. 1994.
- Teixeira, L. G. M., Cunha, G. M. A., Matos, M. E. O., Silva, J. C. R., Rao, V. S. N. Efeito da Fração purificada da *Wilbrandia*(cf)*verticilata* na lesão granulomatosa induzida pelo óleo de cróton em ratos. IX Reunião anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental, 24-27 agosto, Caxambú, p. 193, 1994.
- Tjølsen, A., Berge, O., Hunskaar, S., Rosland, J. H., Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5-17, 1992.
- Tomlinson, A., Appleton, I., Moore, A. R., Gilroy, D. W., Willis, D., Mitchell, J. A., Willoughby, D. A. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br. J. Pharmacol* 113(3): 693-698, 1994.
- Utsunomiya, I., Nagai, S., Oh-ishi, S. Differential effects of indometacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. *Eur. J. Pharmacol.* 252: 213-218, 1994.
- Vacher, P. J., Duchéne-Marullaz, P. e Barbot, P. A propos de quelques produits usuels – comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. *Med. Exp.* 11: 51-58, 1964.
- Valente, L. M. M., Gunatilaka, L., Kingston, D. G. I., Pinto, A. C. 17. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 24-27 mai, PN-60, 1994.
- Valente, L. M. M., Gunatilaka, L., Kingston, D. G. I., Pinto, A. C. New norcucurbitacin and heptanorcucurbitacin glucosides from *Fevillea trilobata*. *J. Nat. Prod.* 56, 1772, 1993.
- Vane, J. R. e Botting, R. M. Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Semin. Arthritis Rheum.* 6(S1): 2 – 10, 1997.

- Vane, J. R. e Botting, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*, 44: 1-10, 1995.
- Vane, J. R. Inhibition of prostaglandins synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 231: 232 – 235, 1971.
- Vane, J. R. Towards a better aspirin. *Nature* 367: 215, 1994.
- Voet, D. e Voet, J. G. *Biochemistry*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. NY. USA, p. 74, 1995.
- Wallace, J. L. e Tigley, A. W. Review article: new insights into prostaglandins and mucosal defence. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9:227-235, 1995.
- Wallace, J. L. Mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) induced gastrointestinal damage-potential for development of gastrointestinal tract safe NSAIDs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 1493 – 1498.
- Weckert, E., Hummer, K., Dominguez, X. A., Horn, K., Achenbach, H. the absolute configuration of kinoin C. *Phytochemistry*, 33, 447-448, 1993.
- Wen S. F., Parthasarathy R., Llipoulos, O., Oberley, T. D. Acute renal failure following binge drinking and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Kidney Dis.* 20: 281-285. 1992.
- Whittle, B. A. Release of a Kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *Int. J. Neuropharmacol.* 3: 369-378, 1964.
- Williams, T. J., Morley, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in infammation, *Nature* 246: 215- ,1973
- Wolfe, S. L.; Horrocks, L. A. Eicosanoides. In: *Basis Neurocheminstry: Molecular, Celular and Medical Aspects*. Eds. Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Molinoff, P. B., et al., p. 475-498, New York; Raven Press Ltd, 1994.
- Yamada, M., Niki, H., Yamashita, M., Mue, S., Ohuchi, K. Prostaglandin E₂ poduction dependent upon cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 and its contradictory modulation by auranofin in rat peritoneal macrophages. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 281 1005-1012, 1997.
- Yamamoto, S., Dunn, C. J., Capasso, F., Deporter, D. A., Willoughby, D. A., Huskisson, E. C. Quantitative studies on cell-mediated immunity in the pleural cavity of guinea pigs. *J. Pathol.*, 117: 65-73, 1975.

Yamamoto, T., Yaksh, T. L. Comparison of the antinociceptive effects of pre and post treatment with intrathecal morphine and MK-801, an NMDA antagonists, on the formalin test in the rat. *Anesthesiol.* 77: 757-763, 1992.

Yesilada, E., Tanaka, S., Sezik, E., Tabata, M. Isolation of an anti-inflammatory principle from the juice of *Ecballium elaterium*. *Journal of Natural Products* 51, 504 – 508, 1988

Yesilada, E., Tanaka, S., Tabata, M. Anti-inflammatory effects of the juice of *Ecballium elaterium* on the edemas in mice. *Phytother. Res.* 3, 75 - 76. 1989

Zurrier, R. B. Prostaglandins, Leukotrienes, and related compounds. In: Kelley W. N., Harris Jr, E. D., Ruddy, S. Sledge, C. B.(eds): *textbook of Rheumatology*, Philadelphia, W. B. Saunders, p. 201-212, 1993.