



Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANA BEATRIZ PIMENTEL MONTANHER**

**Estudo do mecanismo de ação dos extratos de *Passiflora edulis*  
variação *flavicapa* Degener em modelos de inflamação aguda, em  
camundongos**

Florianópolis/SC, fevereiro de 2006



Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Estudo do mecanismo de ação dos extratos de *Passiflora edulis* variação *flavica* Degener em modelos de inflamação aguda, em camundongos**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aluna: Ana Beatriz Pimentel Montanher

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Tânia Silvia Fröde

“Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus ao mar o perigo e o abismo  
deu,  
Mas nele é que espelhou o céu.”

*Fernando Pessoa (1888-1935)*  
*Mensagem, Mar Português*

A meus pais, Carlos e Ivone, por todo carinho, incentivo e apoio incondicional.

Ao Emílio, pelo companheirismo e compreensão.

A professora Tânia pela sua dedicação, disponibilidade e vontade de ensinar.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade de um novo aprendizado, profissional e pessoal e por não esquecer de mim nos momentos difíceis.

A meus pais, Carlos A. Montanher e Ivone S. P. Montanher, pelo carinho, incentivo, apoio e confiança que me confortaram todo o tempo. Tudo que tenho e uma conquista deles também.

Ao meu irmão, Júnior, que sempre me ajudou quando o computador não fazia o mesmo.

Ao Emílio, pelo companheirismo e compreensão de toda ausência.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Tânia S. Fröde, pela preciosa orientação, atenção e confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Eloir P. Schenkel e à Silvana M. Zucolotto, pelas valiosas sugestões e produção dos extratos estudados.

Aos Profs. Drs. Inês M. C. Brighente, Moacir G. Pizzolatti e Peter Köll, pela oportunidade de aprendizado que me ofereceram em seus laboratórios.

Ao pessoal do laboratório que tiveram a paciência de ouvir minhas reclamações. Ao Álvaro que me ensinou a pleurisia e acompanhou os primeiros experimentos, à Zili por suas palavras amiga, ao Robson e a Stella (a diretoria) pelos experimentos e momentos de descontração compartilhados, à Jucélia pela ajuda com os dados da bolsa de ar, a Silvana que me ensinou a bolsa de ar, ao Rafael pelo companheirismo, a vocês meu obrigado de coração.

Agradeço as amigas e colegas do mestrado, Indianara, Ângela, Januária, Elisiane, Talise, Leonilda e Françoise pelos momentos de aprendizagem, descontração e alegria. E aos meus amigos do peito: Valquíria, Danielle, Alexandre, Gunnar, Isabele, Léia, Marcos, Melissa, Iara, Bruno, Deyse, Patrícia, Fernanda Ueda e Fernanda Cortz que presentes ou não, sempre auxiliaram de alguma maneira.

Aos funcionários do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário pelo auxílio na realização das técnicas.

À Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, funcionários do Departamento de Pós-graduação em Farmácia pela oportunidade de conviver e adquirir novos e importantes conhecimentos.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me dedicaram parte de seu tempo e esforço. Então, a todos vocês que fazem parte de minha vida o meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

	Pag.
Lista de abreviações	i
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1. PLANTAS MEDICINAIS</b>	1
<b>1.2. O GÊNERO <i>Passiflora</i></b>	1
<b>1.2.1. Constituintes químicos</b>	3
<b>1.2.2. Informações farmacológicas</b>	4
<b>1.2.3. Informações toxicológicas</b>	5
<b>1.3. O PROCESSO INFLAMATÓRIO</b>	6
<b>1.3.1. Células do processo inflamatório</b>	7
<b>1.3.1.1. <i>Polimorfonucleares</i></b>	7
<b>1.3.1.2. <i>Mononucleares</i></b>	8
<b>1.3.2. Enzimas do processo inflamatório</b>	8
<b>1.3.2.1. <i>Mieloperoxidase</i></b>	8
<b>1.3.2.2. <i>Adenosina-deaminase</i></b>	9
<b>1.3.3. Mediadores do processo inflamatório</b>	10
<b>1.3.3.1. <i>Óxido nítrico</i></b>	10
<b>1.3.3.2. <i>Citocinas</i></b>	11
<b>1.3.3.3. <i>Cininas</i></b>	14
<b>1.3.3.4. <i>Aminas vasoativas</i></b>	16
<b>1.3.3.5. <i>Taquicininas</i></b>	17
<b>1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO</b>	19
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	22
<b>3. OBJETIVOS</b>	26
<b>3.1. OBJETIVO GERAL</b>	26
<b>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
<b>4.1. MATERIAL BOTÂNICO</b>	27

4.1.1. Coleta e identificação	27
4.1.2. Preparação dos extratos	27
4.2. FÁRMACOS E REAGENTES	28
4.3. ANIMAIS	30
4.4. PROCEDIMENTO ANESTÉSICO	30
4.5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	30
4.6. MÉTODOS	31
4.6.1. Modelos de inflamação aguda utilizados	31
4.6.2. Técnicas utilizadas	33
4.6.2.1. <i>Contagem total e diferencial de leucócitos nos lavados pleural e da bolsa de ar</i>	33
4.6.2.2. <i>Determinação do exsudato nos lavados pleural e da bolsa de ar</i>	34
4.6.2.3. <i>Determinação da atividade da mieloperoxidase nos lavados pleural e da bolsa de ar</i>	34
4.6.2.4. <i>Determinação dos níveis de nitrato e nitrito nos lavados pleural e da bolsa de ar</i>	35
4.6.2.5. <i>Determinação da atividade da adenosina-deaminase nos lavados pleural e da bolsa de ar</i>	35
4.6.2.6. <i>Determinação dos níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2 nos lavados pleural e da bolsa de ar</i>	36
4.6.3. Protocolo experimental	38
4.6.3.1. <i>Triagem dos extratos de P. edulis (folhas, raízes e pericarpo), avaliando-se seus efeitos sobre a migração de leucócitos e a exsudação na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia</i>	38
4.6.3.2. <i>Inflamação induzida por diferentes agentes flogísticos no modelo da pleurisia</i>	39
4.6.3.3. <i>Inflamação induzida por diferentes agentes flogísticos no modelo da bolsa de ar</i>	39
4.6.3.4. <i>Efeito do extrato P. edulis folhas, sobre a atividade da mieloperoxidase, níveis de óxido nítrico e atividade da adenosina-deaminase na inflamação induzida pela carragenina no modelo da</i>	42

<i>pleurisia</i>	
<b>4.6.3.5. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas, sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2 na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia</b>	42
<b>4.6.3.6. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas, sobre a migração de leucócitos e exsudação na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da pleurisia</b>	42
<b>4.6.3.7. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas, sobre a migração de leucócitos e exsudação na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar</b>	43
<b>4.6.3.8. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas, sobre a atividade da mieloperoxidase, níveis de óxido nítrico e atividade da adenosina-deaminase na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar</b>	43
<b>4.6.3.9. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas, sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2 na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar</b>	44
<b>4.6.3.10 Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas, sobre a migração de leucócitos e exsudação na inflamação induzida por bradicinina, histamina ou substância P no modelo da bolsa de ar</b>	44
<b>4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	44
<b>5. RESULTADOS</b>	45
<b>5.1. RESULTADOS OBTIDOS NO MODELO DA PLEURISIA</b>	45
<b>5.1.1. Triagem dos extratos de <i>P. edulis</i> (folhas, raízes e pericarpo) avaliando-se seus efeitos sobre a migração de leucócitos e a exsudação, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia</b>	45
<b>5.1.2. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas sobre a atividade da mieloperoxidase, níveis de nitrato/nitrito e atividade da adenosina-deaminase, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia</b>	50



<b>5.1.3. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia</b>	<b>52</b>
<b>5.1.4. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas sobre a migração de leucócitos e exsudação, na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da pleurisia</b>	<b>54</b>
<b>5.2. RESULTADOS OBTIDOS NO MODELO DA BOLSA DE AR</b>	<b>60</b>
<b>5.2.1. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas sobre a migração de leucócitos e exsudação, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar</b>	<b>60</b>
<b>5.2.2. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas sobre a atividade da mieloperoxidase, adenosina-deaminase e níveis de nitrato/nitrito, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar</b>	<b>64</b>
<b>5.2.3. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar</b>	<b>66</b>
<b>5.2.4. Efeito do extrato <i>P. edulis</i> folhas sobre a migração de leucócitos e exsudação, na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da bolsa de ar</b>	<b>68</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>87</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>89</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>90</b>
<b>10. ANEXO</b>	<b>115</b>

Protocolo e cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais

## LISTA DE ABREVIÇÕES

A <sub>1</sub>	Receptor de adenosina tipo 1
A <sub>2A</sub>	Receptor de adenosina tipo 2A
A <sub>2B</sub>	Receptor de adenosina tipo 2B
A <sub>3</sub>	Receptor de adenosina tipo 3
A549	Linhagem de células epiteliâis pulmonares humanas
A2780	Linhagem de células células ovarianas
ADA	Adenosina-deaminase
ADA-1	Adenosina-deaminase isoforma 1
ADA-2	Adenosina-deaminase isoforma 2
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Teste estatístico paramétrico
B <sub>1</sub>	Receptor de cininas tipo 1
B <sub>2</sub>	Receptor de cininas tipo 2
BK	Bradicinina
C5a	Fração 5a do sistema complemento
cav.	Cavidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD11a	Molécula de adesão do tipo integrina alfa, expressa em leucócitos
CD11b	Molécula de adesão do tipo integrina beta, expressa em leucócitos
CD18	Molécula de adesão do tipo integrina beta, expressa em leucócitos
CD49d	Molécula de adesão do tipo integrina alfa, expressa em células T, monócitos, células endoteliâis e plaquetas
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
C <sub>5</sub> FeN <sub>5</sub> Na <sub>2</sub> O.2H <sub>2</sub> O	Nitroprussiato de sódio
Cg	Carragenina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CGS 21680	Agonista seletivo do receptor A <sub>2A</sub> de adenosina
C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	Dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina
CH <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Formato de amônio
C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	Adenosina
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	Sulfanilamida
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	Fenol
CV	Coefficiente de variação
Dexa	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC ATCC	Cultura padrão americana de <i>Escherichia coli</i> (American type culture collection)
Elisa	Enzimaimunoensaio
ELR	Aminoácidos arginina e leucina ligado ao ácido glutâmico na região amino-terminal
e.p.m.	Erro padrão da média
E-selectina	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em células endotelial
Fab	Fração Fab de imunoglobulina
H <sub>1</sub>	Receptor de histamina tipo 1
H <sub>2</sub>	Receptor de histamina tipo 2
H <sub>3</sub>	Receptor de histamina tipo 3
H <sub>4</sub>	Receptor de histamina tipo 4
HCl	Ácido clorídrico
HIST	Histamina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
IB-MECA	Agonista seletivo do receptor A <sub>3</sub> de adenosina
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular tipo 1
icIL-1Ra	Isoforma intracelulares da interleucina 1 Ra

ICN	Numeraco da exsicata armazenada
IFN $\gamma$	Interferom gama
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-1Ra	Interleucina 1 Ra
IL-1R AcP	Proteína acessória ligada ao receptor de interleucina 1
i.o.	Intraorbital
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intrapleural
J774.A1	Linhagem celular de macrófagos de camundongos
KC	Quemocina de neutrófilo
KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	Inibidor da óxido nítrico sintase
L-NNA	Inibidor da óxido nítrico sintase
LPS	Lipopolissacarídeo
L-selectina	Molécula de adesão do tipo selectina, expressa em leucócitos
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófago 2
MONO	Mononucleares
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Fosfato de sódio monohidratado
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	Fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NECA	Agonista do receptor A <sub>2B</sub> da adenosina
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrio nuclear kappa B
NH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
NK <sub>1</sub>	Receptor do tipo 1 das taquininas
NK <sub>2</sub>	Receptor do tipo 2 das taquininas
NK <sub>3</sub>	Receptor do tipo 3 das taquininas
NK <sub>4</sub>	Receptor do tipo 4 das taquininas
NO	xido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOS	xido nítrico sintase
NOS I e NOSn	xido nítrico sintase constitutiva, expressa em células neuronis
NOS II e NOSi	xido nítrico sintase induzida
NOS III e NOSe	xido nítrico sintase constitutiva, expressa em células endoteliis
NO <sup>x</sup>	Metabólitos do óxido nítrico (nitrato e nitrito)
PAF	Fator de ativacão plaquetária
<i>P. edulis</i>	<i>Passiflora edulis</i> variacão <i>flavicarpa</i> Degener
<i>P. edulis</i> folhas	Extrato aquoso liofilizado obtido das folhas de <i>Passiflora edulis</i> variacão <i>flavicarpa</i> Degener
<i>P. edulis</i> raízes	Extrato aquoso liofilizado obtido das raízes de <i>Passiflora edulis</i> variacão <i>flavicarpa</i> Degener
<i>P. edulis</i> pericarpo	Extrato aquoso liofilizado obtido dos pericarpos de frutos maduros de <i>Passiflora edulis</i> variacão <i>flavicarpa</i> Degener
PBS	Soluo salina tamponada
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandina F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub> ou Prostaciclina I <sub>2</sub>

---

PMN	Polimorfonucleares
Pro-IL-1 $\alpha$	Procursor de interleucina 1 alfa
Pro-IL-1 $\beta$	Procursor de interleucina 1 beta
P-selectina	Molécula de adesão epitelial
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos de camundongos
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
Sal	Animais controle negativo, tratados somente com salina
s.c.	Subcutâneo
sIL-1Ra	Isoforma secretada de interleucina 1 Ra
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
SR 140333	Antagonista do receptor NK <sub>1</sub> de taquicinas
TGF $\beta$	Fator transformador de crescimento beta
TH	Linfócito T auxiliar
TMB	Substrato enzimático, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
U-937	Linhagem celular de monócitos humanos
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
var.	Varição
VCAM-1	Moléculas de adesão vascular tipo 1
VEGF	Fator de permeabilidade vascular
VLA-4	Molécula de adesão do tipo integrina
ZM 241385	Antagonista do receptor A <sub>2A</sub> da adenosina
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de zinco

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Efeito das diferentes doses do extrato *Passiflora edulis* Sims (100-1000 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação. 24
- Figura 2 Efeito do extrato *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação. 25
- Figura 3 Estudo dos efeitos antiinflamatórios dos diferentes extratos de *P. edulis* (folhas, raízes e pericarpo) nos modelos da pleurisia e da bolsa de ar. 41
- Figura 4 Efeito das diferentes doses do extrato *P. edulis* pericarpo (100-500 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação. 48
- Figura 5 Efeito das diferentes doses do extrato *P. edulis* raízes (100-500 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação. 49
- Figura 6 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre a atividade da mieloperoxidase, níveis de nitrato/nitrito (NO<sup>x</sup>) e atividade da adenosina-deaminase. 51
- Figura 7 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2. 53
- Figura 8 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250-500 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da bradicinina (BK 10 nmol/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação. 57
- Figura 9 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da histamina (HIST 100  $\mu$ g/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação. 58
- Figura 10 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da substância P (SP 20 nmol/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação. 59
- Figura 11 Efeito das diferentes doses do extrato *P. edulis* folhas (50-500 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação. 62
- Figura 12 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação. 63

- Figura 13 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h 65  
antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da bolsa de ar de  
camundongos, sobre a atividade da mieloperoxidase, níveis de  
nitrato/nitrito (NO<sup>x</sup>) e atividade da adenosina-deaminase.
- Figura 14 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h 67  
antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da bolsa de ar em  
camundongos, sobre os níveis de citocinas IL-1 $\beta$ , MIP-2, KC e  
TNF $\alpha$ .
- Figura 15 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h 70  
antes da bradicinina (BK 20 nmol/cav.) no modelo da bolsa de ar em  
camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais,  
polimorfonucleares, mononucleares e exsudação.
- Figura 16 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h 71  
antes da histamina (HIST 10  $\mu$ mol/cav.) no modelo da bolsa de ar  
em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais,  
polimorfonucleares, mononucleares e exsudação.
- Figura 17 Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h 72  
antes da substância P (SP 40 nmol/cav.) no modelo da bolsa de ar  
em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais,  
polimorfonucleares, mononucleares e exsudação.
- Figura 18 Hipótese do mecanismo de ação antiinflamatório do extrato *P. edulis* 88  
folhas.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fármacos e reativos utilizados, suas procedências e sua utilização	28
Tabela 2	Valores percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com <i>P. edulis</i> pericarpo (100-500 mg/kg, i.p., 0,5 h) ou <i>P. edulis</i> raízes (100-500 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia, em camundongos	47
Tabela 3	Valores percentuais de inibição da atividade da mieloperoxidase, níveis de óxido nítrico e atividade da adenosina-deaminase em animais tratados com <i>P. edulis</i> folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia, em camundongos	50
Tabela 4	Valores percentuais de inibição ou aumento dos níveis de citocinas: fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 beta, quimocina de neutrófilo e proteína inflamatória de macrófago 2 em animais tratados com <i>P. edulis</i> folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia, em camundongos	52
Tabela 5	Valores percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com <i>P. edulis</i> folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da pleurisia, em camundongos	56
Tabela 6	Valores percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com <i>P. edulis</i> folhas (50-500 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos	61
Tabela 7	Valores percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros inflamatório: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com <i>P. edulis</i> folhas (100 mg/kg, i.p.) administrada de 0,5 a 4 h antes da indução da inflamação pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos	61
Tabela 8	Valores percentuais de inibição da atividade da mieloperoxidase, níveis de óxido nítrico e atividade da adenosina-deaminase em animais tratados com <i>P. edulis</i> folhas (100 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos	64
Tabela 9	Valores percentuais de inibição dos níveis de citocinas: interleucina 1 beta, proteína inflamatória de macrófago 2, quimocina de neutrófilo e fator de necrose tumoral alfa em animais tratados com <i>P. edulis</i> folhas (100 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos	66
Tabela 10	Valores percentuais de inibição dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com <i>P. edulis</i> folhas (100 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da bolsa de ar, em camundongos	69

## RESUMO

**Introdução:** Grande parte dos estudos farmacológicos de espécies do gênero *Passiflora* enfoca principalmente a atividade sobre o Sistema Nervoso Central (DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004), no entanto poucos estudos têm sido realizados na tentativa de avaliar o efeito antiinflamatório deste gênero.

**Objetivo:** Este trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo de ação antiinflamatório do extrato *Passiflora edulis* variação *flavicarpa* Degener, na resposta inflamatória induzida por diferentes agentes flogísticos (carragenina: Cg, bradicinina: BK, histamina: HIST ou substância P: SP), nos modelos da pleurisia e da bolsa de ar, em camundongos.

**Materiais e Métodos:** Os extratos foram preparados na forma de chá, filtrados e liofilizados. Todos estes foram administrados pela via intraperitoneal (i.p.) em ambos modelos. Os animais utilizados foram camundongos albinos suíços, 18 e 30 g. A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleurial de um dos agentes flogísticos: Cg (1% 0,1 mL/cav.), BK (10 nmol/cav.), HIST (100 µg/cav.) ou SP (20 nmol/cav.) e os parâmetros inflamatórios foram avaliados 4 h após. A bolsa de ar foi induzida por injeções subcutâneas de 1,5 mL de ar em três dias alternados e no sexto dia, a inflamação foi induzida por: Cg (1% 0,5 mL/cav.), BK (20 nmol/cav.), HIST (10 µmol/cav.) ou SP (40 nmol/cav.) e a inflamação avaliada 24 h após. Para a avaliação da exsudação, os animais foram tratados com 0,2 mL de solução de azul de Evans (25 mg/mL, intraocular) 40 min ou 1 h antes da indução da inflamação no modelo da pleurisia ou da bolsa de ar, respectivamente. Os parâmetros de inflamação estudados em ambos modelos foram: leucócitos, exsudação, mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA), nitrato/nitrito (NO<sup>x</sup>), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) e quemocina de neutrófilos (KC). A análise estatística foi determinada pelos testes: ANOVA, Dunnett ou teste T de Student. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

**Resultados:** Na triagem dos extratos obtidos das folhas, raízes e pericarpo de frutos maduros de *P. edulis* observou-se que no modelo da pleurisia: o extrato do pericarpo não inibiu a inflamação (P > 0,05). O extrato das raízes (250 e 500 mg/kg, i.p., 0,5 h antes) inibiu os leucócitos (% de inibição: 250 mg/kg: 26 $\pm$ 5; 500 mg/kg: 28 $\pm$ 6) (P < 0,05) e os polimorfonucleares (% de inibição: 250 mg/kg: 75 $\pm$ 10; 500 mg/kg: 96 $\pm$ 1) (P < 0,01). Já o extrato das folhas inibiu os leucócitos (% de inibição: 250 mg/kg: 67 $\pm$ 10) e os polimorfonucleares (% de inibição: 250 mg/kg: 85 $\pm$ 5) (P < 0,05). Nenhum extrato inibiu a exsudação (P > 0,05). No modelo da bolsa de ar, o extrato *P. edulis* folhas (100-500 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da Cg) inibiu os leucócitos (% de inibição: 100 mg/kg: 32 $\pm$ 6; 250 mg/kg: 30 $\pm$ 7; 500 mg/kg: 34 $\pm$ 11) (P < 0,05) e os polimorfonucleares (% de inibição: 100 mg/kg: 48 $\pm$ 6; 250 mg/kg: 35 $\pm$ 11) (P < 0,05). Novamente, este extrato não inibiu a exsudação (P > 0,05). No estudo do perfil temporal nos modelos estudados, este extrato foi capaz de inibir os leucócitos e os polimorfonucleares somente no tempo de tratamento prévio de 0,5 h (P < 0,05). O extrato *P. edulis* folhas (100 e 250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da Cg inibiu a atividade da MPO (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 31 $\pm$ 3; pleurisia: 250 mg/kg: 64 $\pm$ 4) (P < 0,01), ADA (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 50 $\pm$ 3; pleurisia: 250 mg/kg: 62 $\pm$ 5) (P < 0,01), níveis de NO<sup>x</sup> (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 41 $\pm$ 8; pleurisia: 250 mg/kg: 47 $\pm$ 8) (P < 0,05) e IL-1 $\beta$  (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 31 $\pm$ 3; pleurisia: 250 mg/kg: 59 $\pm$ 1) (P < 0,05). As citocinas MIP-2 e TNF $\alpha$



foram inibidas de forma diferente nos modelos de inflamação, MIP-2 (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 48±7) ( $P < 0,05$ ) e  $TNF\alpha$  (% de inibição: pleurisia: 250 mg/kg: 79±1) ( $P < 0,01$ ). Na inflamação induzida pela BK, a administração do extrato *P. edulis* folhas (100 e 500 mg/kg, i.p., 0,5 h antes) inibiu os leucócitos nestes modelos de inflamação (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 47±3; pleurisia: 500 mg/kg: 26±5) ( $P < 0,05$ ), os polimorfonucleares (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 51±2; pleurisia: 500 mg/kg: 45±14;) ( $P < 0,05$ ) e os mononucleares (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 35±6; pleurisia: 500 mg/kg: 23±7) ( $P < 0,05$ ). Na inflamação induzida pela HIST, o extrato *P. edulis* folhas (100 e 250 mg/kg, i.p., 0,5 h antes da HIST) inibiu também os leucócitos (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 53±4; pleurisia: 250 mg/kg: 39±6) ( $P < 0,05$ ) e os polimorfonucleares (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 56±4; pleurisia: 250 mg/kg: 93±2) ( $P < 0,01$ ). Os mononucleares foram inibidos apenas no modelo da bolsa de ar (% de inibição: 100 mg/kg: 57±4) ( $P < 0,01$ ). Já na inflamação induzida pela SP, o extrato *P. edulis* folhas (100 e 250 mg/kg, i.p., 0,5 h antes) inibiu leucócitos (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 60±2; pleurisia: 250 mg/kg: 36±12) ( $P < 0,01$ ) e polimorfonucleares (% de inibição: bolsa de ar: 100 mg/kg: 63±6; pleurisia: 250 mg/kg: 81±11) ( $P < 0,01$ ). Mais uma vez os mononucleares foram inibidos apenas no modelo da bolsa de ar (% de inibição: 100 mg/kg: 57±3) ( $P < 0,01$ ).

**Conclusão:** O extrato obtido das folhas de *P. edulis* foi mais efetivo em inibir a inflamação que os extratos das raízes e do pericarpo. Os resultados sugerem que a inibição da inflamação principalmente àquela relacionada com a migração leucocitária deve estar relacionada à inibição de mediadores pró-inflamatórios relacionados a quimiotaxia celular como  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ , MIP-2, BK, HIST, SP e  $NO^x$ . Além disso, o extrato *P. edulis* folhas também foi efetivo em inibir enzimas relacionadas à atividade dos leucócitos como a MPO e a ADA. Estudos devem ser realizados na tentativa de elucidar melhor o mecanismo de ação antiinflamatório do extrato *P. edulis* folhas bem como identificar a(s) substância(s) responsável(is) por estes efeitos.

**Palavra-chave:** *Passiflora edulis*, pleurisia, bolsa de ar.

## ABSTRACT

**Study of the action mechanism of *Passiflora edulis* form *flavicarpa* Degener extracts in acute inflammation models, in mice**

**Introduction:** Most of the pharmacological work on *Passiflora* species has been carried out on the Central Nervous System (DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004), however there are few studies about their anti-inflammatory properties.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the pharmacological mechanism of anti-inflammatory effect of aqueous lyophilized extract of *Passiflora edulis* form *flavicarpa* Degener on the inflammatory response induced by different phlogistic agents (carrageenan: Cg, bradykinin: BK, histamine: HIST or substance P: SP) on the models of pleurisy and air pouch in mice.

**Material and methods:** The dried and powdered leaves were extracted by infusion in boiling water, filtered and lyophilized. All extracts were administrated by intraperitoneal route (i.p.). Non-fasted adult Swiss mice, between 18 and 30 g, were used throughout the experiments. The pleurisy was induced by a single injection of 0.1 ml of different phlogistic agents: Cg (1%/cav.), BK (10 nmol/cav.), HIST (100 µg/cav.) or SP (20 nmol/cav.) administered by intrapleural route. The inflammatory parameters were analyzed 4 h after pleurisy induction. In the air pouch model different groups of animals received 1.5 mL of air by 3 alternate days for air pouch formation and on the sixth day, the inflammation was induced by Cg (1% 0.5 mL/cav.), BK (20 nmol/cav.), HIST (10 µmol/cav.) or SP (40 nmol/cav.) administered by subcutaneous route. The inflammation was analyzed 24 h after. In both models, the pleural and air pouch lavages were collected to analyze the following inflammatory parameters: leukocyte, exudation, myeloperoxidase (MPO), adenosine-deaminase (ADA), nitric oxide (NO<sup>x</sup>), tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and neutrophil chemokine (KC) levels. On the day of experiments, all animals, except those groups which were analyzed MPO, ADA activities, NO<sup>x</sup> and cytokines levels, were injected 40 min (pleurisy) or 1 h (air pouch) previously with a solution of Evans blue dye (25 mg/kg, 0.2 mL, intraocular) to evaluate the exudation. Significance was determined by analysis of variance (ANOVA) and complemented with either Dunnett's or Student's t tests. Values of P < 0.05 were considered significant.

**Results:** The screening of the extracts obtained from leaves, pericarp and roots of *P. edulis* showed that *P. edulis* pericarp did not inhibit the leukocytes or exudation on the mouse model of pleurisy induced by Cg. The roots extract (250-500 mg/kg, i.p., 0.5 h before) inhibited the leukocytes (% of inhibition: 250 mg/kg: 26 $\pm$ 5; 500 mg/kg: 28 $\pm$ 6) (P < 0.05) and neutrophils (% of inhibition: 250 mg/kg: 75 $\pm$ 10; 500 mg/kg: 96 $\pm$ 1) (P < 0.01). The *P. edulis* leaves inhibited the leukocytes (% of inhibition: 67 $\pm$ 10) and neutrophils (% of inhibition: 85 $\pm$ 5). (P < 0.05). Any extracts did not inhibit the exudation (P > 0.05). In the air pouch model *P. edulis* leaves extract (100-500 mg/kg, i.p., 0.5 h before Cg) decreased the leukocytes (% of inhibition: 100 mg/kg: 32 $\pm$ 6; 250 mg/kg: 30 $\pm$ 7; 500 mg/kg: 34 $\pm$ 11) (P < 0.05) and neutrophils (% of inhibition: 100 mg/kg: 48 $\pm$ 6; 250 mg/kg: 35 $\pm$ 11) (P < 0.05). This extract also did not inhibit the exudation in the air pouch models (P > 0.05). The time course profile study showed that *P. edulis* leaves extract inhibited the leukocytes and neutrophils only 0.5 h of pretreatment time (P < 0.05). The *P. edulis* leaves extract (100 and 250 mg/kg, i.p.) administered 0.5 h before Cg also decreased the activity of MPO (% of inhibition: air pouch: 100 mg/kg: 31 $\pm$ 3; pleurisy: 250 mg/kg: 64 $\pm$ 4) (P < 0.01), ADA (% of

inhibition: air pouch: 100 mg/kg:  $50 \pm 3$ ; pleurisy: 250 mg/kg:  $62 \pm 5$ ) ( $P < 0.01$ ), levels of  $\text{NO}^x$  (% of inhibition: air pouch: 100 mg/kg:  $41 \pm 8$ ; pleurisy: 250 mg/kg:  $47 \pm 8$ ) ( $P < 0.05$ ) and  $\text{IL-1}\beta$  (% of inhibition air pouch: 100 mg/kg:  $31 \pm 3$ ; pleurisy: 250 mg/kg:  $59 \pm 1$ ) ( $P < 0.05$ ) in both inflammation models. The MIP-2 and  $\text{TNF}\alpha$  were also inhibited in different models: MIP-2 (% of inhibition: air pouch: 100 mg/kg:  $48 \pm 7$ ) ( $P < 0.05$ ) and  $\text{TNF}\alpha$  (% of inhibition: pleurisy: 250 mg/kg:  $79 \pm 1$ ) ( $P < 0.01$ ). The *P. edulis* leaves extract (100 and 500 mg/kg, i.p., 0.5 h before) also inhibited the leukocytes in both studied inflammation models induced by BK (% of inhibition: air pouch: 100 mg/kg:  $47 \pm 3$ ; pleurisy: 500 mg/kg:  $26 \pm 5$ ) ( $P < 0.05$ ), neutrophils (% of inhibition: air pouch: 100 mg/kg:  $51 \pm 2$ ; pleurisy: 500 mg/kg:  $45 \pm 14$ ) ( $P < 0.05$ ) and mononuclears (% of inhibition: air pouch: 100 mg/kg:  $35 \pm 6$ ; pleurisy: 500 mg/kg:  $23 \pm 7$ ) ( $P < 0.05$ ). The *P. edulis* leaves extract (100 and 250 mg/kg, i.p., 0.5 h before HIST) decreased the leukocytes (% of inhibition: air pouch: 100 mg/kg:  $53 \pm 4$ ; pleurisy: 250 mg/kg:  $39 \pm 6$ ) ( $P < 0.05$ ) and neutrophils (% of inhibition: 100 mg/kg:  $56 \pm 4$ ; pleurisy: 250 mg/kg:  $93 \pm 2$ ) ( $P < 0.01$ ) in the pleurisy and air pouch models induced by HIST. The mononuclears was also inhibited by this extract on the air pouch model (% of inhibition: 100 mg/kg:  $57 \pm 4$ ) ( $P < 0.01$ ). The *P. edulis* leaves extract (100 and 250 mg/kg, i.p., 0.5 h before SP) inhibited the leukocytes (% of inhibition: air pouch: 100 mg/kg:  $60 \pm 2$ ; pleurisy: 250 mg/kg:  $36 \pm 12$ ) ( $P < 0.01$ ) and neutrophils (% of inhibition: 100 mg/kg:  $63 \pm 6$ ; pleurisy: 250 mg/kg:  $81 \pm 11$ ) ( $P < 0.01$ ). Once again the mononuclears were inhibited only in the air pouch model (% of inhibition: 100 mg/kg:  $57 \pm 3$ ) ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** The extract from leaves of *P. edulis* was more effective in inhibiting leukocytes than roots or pericarp extracts on the mouse model of pleurisy induced by Cg. The results demonstrated that the inhibitory effect of *P. edulis* on leukocyte migration must be related to inhibition of pro-inflammatory mediators that have important role in the leukocyte chemotaxis such as  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , MIP-2, BK, HIST, SP and  $\text{NO}^x$ . Furthermore, the *P. edulis* leaves extract was also effective in inhibiting MPO and ADA that are related to leukocyte activation. Studies must be done to better clarify the anti-inflammatory mechanism of this extract, as well as which compound(s) is(are) responsible to these effects.

**Key word:** *Passiflora edulis*, pleurisy, air pouch.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PLANTAS MEDICINAIS

As plantas fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimento, de materiais para vestuário, habitação, utilidades domésticas bem como fonte de terapia (SCHENKEL, GOSMAN, PETROVICK, 2001). As plantas são importantes fontes de substâncias naturais biologicamente ativas, muitas das quais podem ser utilizadas como modelo para a síntese de compostos ativos e/ou seletivos para o tratamento de determinada doença. A síntese é realizada por meio de estudos sobre a estrutura e a atividade biológica, visando determinar quais são os fatores mais importantes relacionados à determinada atividade (CORDELL, 1995). Embora muitos compostos derivados de plantas com efeitos medicinais possam ser sintetizados em laboratórios, tal síntese é complexa e os rendimentos, muitas vezes, são baixos e a produção economicamente inviável (FRANÇA, 2001).

No Brasil, a utilização de medicamentos fitoterápicos ou preparados extraídos de plantas é significativa, isto porque a biodiversidade da flora brasileira é grande e apresenta um importante potencial terapêutico. Além disso, o difícil acesso aos medicamentos convencionais tendo em vista o alto custo, torna interessante o uso de terapias alternativas e o uso terapêutico de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas (SCHENKEL, 1998; RATES, 2001). É importante também ressaltar que a indústria farmacêutica no Brasil possui um faturamento significativo na faixa de U\$ 10 bilhões e estima-se que 25% deste faturamento seja originado de medicamentos derivados de plantas (GARCIA *et al.*, 1996 apud GUERRA e NODARI, 2001). Estes fatos fazem com que muitos pesquisadores investiguem as propriedades químicas e biológicas de plantas.

### 1.2. O GÊNERO *Passiflora*

Estudos têm demonstrado a presença de sementes de *Passiflora* a milhares de anos em sítios arqueológicos da Virgínia e na América do Norte. Este fato demonstra que esta planta é conhecida por diferentes civilizações há muitos anos (GREMILLION, 1989).

O gênero *Passiflora* pertence à família *Passifloraceae*. Esta família é composta por cerca de 630 espécies distribuídas em 18 gêneros, compreendendo lianas herbáceas ou lenhosas e arbustos (TAKHTAJAN, 1997).

O gênero *Passiflora* é o maior gênero na família *Passifloraceae*, com cerca de 400 espécies, nativas da América tropical, desde o sul dos Estados Unidos, México até o sul da América do Sul, incluindo o Brasil, sendo rara na Ásia, Austrália e África tropical (PIO CORRÊA, 1978a; BLUMENTHAL, GOLDBERG, BRINCKMANN, 2000; DerMARDEROSIAN, 2001; DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004).

Diversas espécies desta família são conhecidas em todo o Brasil, sendo as mais cultivadas a *Passiflora alata* e a *Passiflora edulis*. A *Passiflora alata* é a única espécie incluída na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977). Além disso, outra espécie muito estudada é a *Passiflora incarnata* L., a qual encontra-se descrita nas Farmacopéias européias (DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004).

A espécie *Passiflora edulis* é encontrada no Brasil, nos Estados do Amazonas, Pará, Paraíba, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SACCO, 1980). Além disso, esta planta também é cultivada mundialmente em muitas outras regiões tropicais e subtropicais devido aos seus frutos empregados na indústria alimentícia. Esta espécie produz dois tipos de frutos, amplamente consumidos: o fruto de cor amarela (*Passiflora edulis* Sims variação *flavicarpa* Degener) e o maracujá roxo (*Passiflora edulis* Sims ou *Passiflora edulis* variação *edulis*) (SPENCER e SEIGLER, 1983; CARVALHO-OKANO e VIEIRA, 2001).

No Brasil, algumas espécies do gênero *Passiflora* são denominadas popularmente de “maracujá” ou “flor da paixão”. Já na Europa e na América do Norte estas são chamadas de “*passion fruit*” ou “*passion flower*” (DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004).

Estas denominações têm origem histórica, uma vez que missionários espanhóis ao descobrirem estas plantas associaram o aspecto de suas flores à crucificação de Cristo, dando assim origem aos nomes populares “flor da paixão” ou “*passion flower*” (PIO CORRÊA, 1978b; PIERCE, 1999; BLUMENTHAL, GOLDBERG, BRINCKMANN, 2000; DerMARDEROSIAN, 2001).

A literatura registra o uso das folhas de *Passiflora alata*, na medicina popular, na forma de chá, como ansiolíticas, diuréticas, emenagogas, antinociceptiva e antipiréticas (SIMÕES *et al.*, 1998). As suas raízes são utilizadas popularmente como anti-helmínticas, anti-inflamatórias e no tratamento de histerias (SIMÕES *et al.*, 1998; MORS, RIZZINI, PEREIRA, 2000). Além disso, as raízes de *Passiflora edulis*

também são usadas popularmente como ansiolíticas, vermífugas e também no tratamento de histerias (MORS, RIZZINI, PEREIRA, 2000). O gênero *Passiflora* também é utilizado em inflamações na pele (D'OLIVEIRA, 1854; MOREIRA, 1862; PIO CORRÊA, 1978a; MORS, RIZZINI, PEREIRA, 2000), tratamento de bronquites (MORS, RIZZINI, PEREIRA, 2000), queimaduras, hemorróidas, climatério, desordens de atenção e ansiedade (DerMARDEROSIAN, 2001), além do tratamento de icterícia, escorbuto e disenteria (GUPTA, 1995; MORS, RIZZINI, PEREIRA, 2000).

Atualmente, a casca do maracujá, normalmente descartada, vem sendo utilizada para o preparo de farinha. O uso da farinha é justificado pela sua alta concentração de fibras solúveis e insolúveis, o que acarreta uma diminuição da velocidade de absorção de carboidratos e de lipídios, auxiliando dessa maneira os regimes de emagrecimento (NEUMANN, 2005).

### 1.2.1. Constituintes químicos

As espécies de *Passiflora* apresentam diversos constituintes, dentre eles alcalóides, fenóis, flavonóides, flavonóides glicosilados, glicosídeos e compostos cianogênicos (DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004). Porém o(s) composto(s) responsável(is) por seus efeitos farmacológicos ainda não foram totalmente elucidados.

A presença de alcalóides nas plantas do gênero *Passiflora* é um assunto controverso. Estudos datados de 1975 citam a presença destes compostos (LUTOMSKI e MALEK, 1975). No entanto, outros estudos mais recentes com metodologias mais sensíveis, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), não têm detectado estes compostos em espécies de *Passiflora* (REHWALD, MEIER, STICHER, 1995; GRICE, FERREIRA, GRIFFITHS, 2001).

Os flavonóides são os compostos majoritários, sendo encontrados nas folhas e partes aéreas e são representados pelos C-glicosídeos derivados da apigenina e da luteolina. Recentes estudos utilizando a técnica de ultravioleta demonstraram teores destas substâncias nas folhas de espécies de *Passiflora* na faixa de 1,9 a 4,6% (PETRY *et al.*, 2001; DE-PARIS *et al.*, 2002).

Das partes aéreas da *Passiflora edulis*, foram isolados os flavonóides C-glicosídicos: luteolina-6-C-chinosídeo, luteolina-6-C-fucosídeo (MARECK *et al.*, 1991), vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina, tanto no extrato hidroetanólico

(PETRY *et al.*, 2001) como no extrato aquoso (DE-PARIS *et al.*, 2002), sendo que nestas frações o conteúdo total de flavonóides obtido foi de 4,60% e 4,04%, respectivamente, ambos em relação à planta seca.

Além dos flavonóides, também foram identificados nesta espécie: glicosídeos cianogenéticos (SEIGLER *et al.*, 2002),  $\beta$ -rutinosídeo (CHASSAGNE e CROUZET, 1998), sambugrina e amigdalina (CHASSAGNE *et al.*, 1996), alcalóides indólicos (LUTOMSKI e MALEK, 1975), terpenóides (WINTERHALTER, 1990; YOSHIKAWA *et al.*, 2000) e saponinas (YOSHIJAWA *et al.*, 2000).

### 1.2.2. Informações farmacológicas

Em relação às plantas medicinais, poucas possuem o seu efeito terapêutico comprovado, por este motivo o estudo dos seus efeitos biológicos é importante.

As plantas medicinais podem conter um ou vários compostos biologicamente ativos que podem atuar de maneira isolada ou sinérgica promovendo o efeito terapêutico (WILLIAMSON, 2000; SPINELLA, 2002). Estudos sobre plantas do gênero *Passiflora* apontam diferentes substâncias responsáveis pelos efeitos farmacológicos como por exemplo: alcalóide harmano,  $\gamma$ -pirona maltol e flavona crisina (AOYAGI *et al.*, 1974; SPERONI e MINGHETTI, 1988; WOLFMAN *et al.*, 1994; ALONSO, 1998; ZANOLI, AVLLONE, BARALDI, 2000).

Grande parte dos estudos farmacológicos de espécies do gênero *Passiflora* enfoca a atividade de *Passiflora incarnata* sobre o sistema nervoso central (SNC) (DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004). Entre as atividades avaliadas para diferentes espécies e comprovadas farmacologicamente, citam-se principalmente a: ansiolítica (SPERONI e MINGHETTI, 1988; MALUF *et al.*, 1991; SOULIMANI *et al.*, 1997; AKHONDZADEH *et al.*, 2001; DHAWAN, KUMAR, SHARMA, 2001a, b, c; PETRY *et al.*, 2001; DE-PARIS *et al.*, 2002; CAPASSO e SORRENTINO, 2005) e a anticonvulsivante (OGA *et al.*, 1984; SANTOS, SANTOS, OLIVEIRA, 2005).

Outras atividades também têm sido comprovadas: antitussígena (DHAWAN e SHARMA, 2002a), inibição da ansiedade decorrente da abstinência alcoólica (DHAWAN, KUMAR, SHARMA, 2002), prevenção da esterilidade e diminuição da libido induzida por álcool e nicotina (DHAWAN e SHARMA, 2002b) e analgésica (VALE e LEITE, 1983; OGA *et al.*, 1984, SPERONI e MINGHETTI, 1988).

Em relação a inflamação, Borrelli e colaboradores (1996) estudaram a atividade antiinflamatória do extrato hidroetanólico da *Passiflora incarnata*, em ratos,

utilizando três modelos: 1) edema de pata induzido por carragenina, 2) pleurisia induzida por dextran e 3) formação de granulomas induzidos por cróton. Os resultados sugerem que o extrato testado exibe importante atividade antiinflamatória em diferentes modelos experimentais inibindo o edema, a celularidade e o granuloma.

A atividade antiinflamatória dos extratos dos frutos de *Passiflora edulis* e *Passiflora foetida* também foi estudada *in vitro*, utilizando cultura celular. Neste protocolo experimental, avaliou-se o efeito dos extratos sobre a atividade das metaloproteases-2 e 9, envolvidas na metástase e angiogênese. Ambos os extratos, demonstraram efeitos inibitórios dependentes da dose sobre a atividade das proteínas metaloproteases-2 e 9 (PURICELLI *et al.*, 2003).

### 1.2.3. Informações toxicológicas

Estudos realizados por Vale e Leite (1983) demonstraram efeito tóxico do extrato aquoso de *Passiflora edulis*, em experimentos *in vivo*. Neste estudo, camundongos, foram tratados com este extrato nas doses de 85 a 2.740 mg/kg, administrados por via intraperitoneal. Nas doses mais elevadas (685, 1370 e 2740 mg/kg) a maioria dos animais apresentou contrações abdominais e distensão das patas posteriores, indicando uma possível irritação da cavidade peritoneal. Na dose mais alta (2740 mg/kg), observou-se taquicardia, ataxia e dispnéia, seguida de morte.

Outros estudos também demonstraram efeito hepatotóxico do extrato aquoso das folhas de *Passiflora edulis* em experimentos animais. Neste estudo, o extrato de *Passiflora edulis* foi administrado por via oral, na forma de chá (1%), em ratos por 60 dias. Os resultados demonstraram nestes animais o aumento sérico da enzima gama-glutamilttransferase (MALUF *et al.*, 1991).

Em outros experimentos estudou-se o possível efeito teratogênico de extratos aquosos liofilizados de *Passiflora edulis* e *Passiflora alata*, em ratas gestantes. Neste estudo as ratas gestantes receberam o extrato de *Passiflora edulis* ou *Passiflora alata* ambos na dose de 800 mg/kg/dia, administrados por via oral, durante toda a gestação (21 dias). As seguintes variáveis foram estudadas: consumo de água e alimento, massa corporal, contagem dos corpos lúteos e dos sítios de implantação uterina. Além disso, as características da prole foram avaliadas através das seguintes variáveis: massa corporal, desenvolvimento físico, sexual e



comportamental. Os resultados demonstraram que o desenvolvimento dos filhotes durante a gestação manteve-se normal nas ratas tratadas com um dos extratos estudados. Neste estudo não foram observadas alteração no desenvolvimento físico, sexual e comportamental das ninhadas, indicando ausência de toxicidade para ratas tratadas e prole (AMARAL, SCHENKEL, LANGELOH, 2001).

### 1.3. O PROCESSO INFLAMATÓRIO

O sistema imune dos mamíferos possui vários mecanismos de defesa, contra a invasão de microrganismos, trauma e até neoplasias. Este sistema também possui a capacidade de remover proteínas desnaturadas e células que perderam a sua função. O sistema imune é composto por diversos órgãos incluindo o timo, a medula óssea e o baço, com suas inúmeras células que possuem a função de reconhecimento/captura de antígenos e proteção do tecido hospedeiro.

A reação inflamatória é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado (NATHAN, 2002). O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente induzida pelo acúmulo de leucócitos, colágeno entre outras substâncias que podem ser prejudiciais ao organismo (NATHAN, 2002).

Didaticamente, a resposta inflamatória pode ser dividida em três fases distintas. Inicialmente existe uma fase aguda, de duração variável, onde ocorre vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, seguida de uma fase subaguda caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas e posteriormente, ocorre regeneração tecidual ou fibrose (SUZUKI *et al.*, 2003).

Na primeira fase da reação inflamatória, predominam os eventos vasculares: vasodilatação na área lesada, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade e recrutamento de vasos normalmente hipofuncionantes, que é responsável pelo eritema ou rubor da área comprometida. Além disso, pode ocorrer também elevação da temperatura local (calor) (LATEY, 2001). A vasodilatação se deve a liberação de diferentes mediadores: cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, PAF-acéter, fração C5a do sistema complemento, prostaglandinas

(PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>) e substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - (CGRP) (HEDQVIST, GAUTAM, LINDBOM, 2000; LECCI *et al.*, 2000). Este aumento da permeabilidade vascular culmina com a saída de um fluido rico em proteínas (exsudato) para o meio extravascular resultando em acúmulo deste, no local da lesão (edema) (PATTERSON e LUM, 2001). O exsudato formado facilita a liberação de outros mediadores o que amplificam a resposta inflamatória.

Já na fase subaguda ocorre a migração de leucócitos e de outras células fagocíticas para o sítio da lesão. Este evento celular é denominado de quimiotaxia. Os fatores quimiotáticos são gerados tanto na corrente sanguínea quanto no sítio da lesão. Assim, o sistema complemento e as cininas são considerados importantes fatores quimiotáticos de origem plasmática (FRANGOGIANNIS, SMITH, ENTMAN, 2002). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes é fundamental para a defesa do organismo, devido a sua capacidade fagocítica e de destruição do agente nocivo.

Após um estímulo a resposta inflamatória é caracterizada por uma série de eventos na tentativa de reconstituir o tecido danificado por meio da ativação de células mesenquimatosas, incluindo hipertrofia, hiperplasia e produção de matriz extracelular. Posteriormente, a injúria inflamatória é mantida e induz o processo de cicatrização que freqüentemente reconstitui o local lesado com tecido fibroso não especializado (SUZUKI *et al.*, 2003).

### **1.3.1. Células do processo inflamatório**

#### **1.3.1.1. Polimorfonucleares**

Os polimorfonucleares são os leucócitos mais abundantes e as primeiras células a serem recrutadas para o local de inflamação, são eles os responsáveis, juntamente com os macrófagos, pela fagocitose e destruição do agente lesivo (PETTERSEN e ADLER, 2002). Após a adesão destas células ao endotélio e transmigração para o sítio inflamatório, ocorre o reconhecimento e a fagocitose do agente estranho. Em seguida, o agente estranho é fundido a lisossomas, os quais contêm enzimas como a mieloperoxidase, proteases e espécies reativas de oxigênio (RODRIGUES *et al.*, 2002; FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003).

Os grânulos citoplasmáticos presentes nos polimorfonucleares podem ser do tipo azurófilos ou secundários. No interior dos grânulos azurófilos encontra-se a

enzima mieloperoxidase, uma peroxidase que cataliza a produção de ácido hipocloroso gerando produtos oxidantes de forte ação microbicida, fatores bactericidas (lisozima, defensinas), hidrolases ácidas e as proteases neutras (elastase, catepsina G, collagenases inespecíficas). No interior do grânulo secundário encontram-se: lisozima, collagenase, gelatinase, lactoferrina, histaminase, fosfatase alcalina e ativador de plasminogênio (ROBBINS *et al.*, 2001).

A migração de leucócitos para o local de inflamação é um acontecimento comum em diversas patologias como na pneumonia e na doença obstrutiva pulmonar crônica. O aumento de polimorfonucleares ativados em tecidos promove uma lesão decorrente da liberação de suas substâncias tóxicas, incluindo proteases e espécies reativas de oxigênio, resultando na progressão da doença (FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003).

### **1.3.1.2. Mononucleares**

O sistema fagocítico mononuclear é composto por dois tipos de células com funções distintas: os monócitos e os macrófagos. Os macrófagos são monócitos teciduais em sua forma madura, cuja função é remover antígenos particulados e atuar como células apresentadoras de antígeno, internalizando e apresentando antígenos aos linfócitos T (KIM, KIM, LEE, 2003).

Diferente dos macrófagos, que são células residentes e apresentam variações morfológicas e funcionais conforme o tipo de tecido em que se encontram, os monócitos são células que migram para vários órgãos e cavidades do corpo, pelo qual podem diferenciar-se em macrófagos. A aterosclerose é um exemplo onde ocorre migração e diferenciação de monócitos, sendo que este processo é dependente da liberação de proteína quimiotática de monócito-1 e fator estimulante de colônia de macrófago em células endoteliais e da musculatura lisa (TAKAHASHI, TAKEYA, SAKASHITA, 2002).

## **1.3.2. Enzimas do processo inflamatório**

### **1.3.2.1. Mieloperoxidase**

A mieloperoxidase é uma enzima liberada principalmente dos grânulos azulófilos de neutrófilos ativados e corresponde a 5% do peso seco destas células.

Após a fagocitose de um agente lesivo, os neutrófilos ativam o metabolismo oxidativo, “*burst*” respiratório, caracterizado por um intenso consumo de oxigênio e

produção de espécies reativas de oxigênio. A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, converte o oxigênio molecular em ânion superóxido. A seguir, a enzima superóxido dismutase converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual possui função de destruir bactérias diretamente ou após sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso. Além disso, o ácido hipocloroso é considerado um potente agente microbicida que possui papel importante na defesa do hospedeiro contra invasão de bactérias, fungos e vírus (NEVE, PARIJ, MOGUILVSKY, 2001). Contudo, a liberação excessiva dessas espécies reativas pode promover lesão tecidual (GAUT *et al.*, 2001).

A deficiência de mieloperoxidase constitui o distúrbio hereditário mais comum da função dos neutrófilos, com uma estimativa de frequência de 1 em cada 4000 casos na Itália (MARCHETTI *et al.*, 2004a). A deficiência de mieloperoxidase é uma doença considerada autossômica recessiva. A base genética desta doença parece ser complexa e heterogênea (MARCHETTI *et al.*, 2004b). Hoje em dia conhece-se pelo menos 11 alelos mutantes com alta variabilidade promovendo desta forma a liberação de uma mieloperoxidase inativa dando origem a doença. A deficiência de mieloperoxidase em relação a sua função ou concentração, está relacionada ao gene MIM# 606989 (MARCHETTI, *et al.*, 2004b). Estudos têm demonstrado que pacientes com deficiência desta enzima possuem infecções recorrentes por *Candida sp* ou por bactérias. Este fato também foi observado em modelos animais utilizando camundongos deficientes para esta enzima (NGUYEN e KATNER, 1997; ARATANI *et al.*, 1999).

### **1.3.2.2. Adenosina-deaminase**

Dentre as enzimas envolvidas na inflamação pode-se destacar também a adenosina-deaminase, pelo qual em grandes quantidades pode diminuir consideravelmente os níveis de adenosina, um poderoso autacóide antiinflamatório (MABLEY *et al.*, 2003).

A adenosina-deaminase é uma enzima liberada principalmente de linfócitos ativados e que participam do metabolismo das purinas catalisando irreversivelmente a deaminação da desoxiadenosina e adenosina em desoxinosina e inosina, respectivamente. A adenosina-deaminase também possui um papel importante na maturação e ativação de monócitos e linfócitos (CRISTALLI *et al.*, 2001; ALDRICH *et al.*, 2003).

A atividade da adenosina-deaminase ocorre por meio da ação de duas isoenzimas denominadas ADA-1 e ADA-2. O aumento da atividade da adenosina-deaminase tem sido encontrado no soro de pacientes com tuberculose, leishmaniose visceral, artrite reumatóide e em tumores (NAKAMACHI *et al.*, 2003; ROKAYAN, 2003; GHANEI *et al.*, 2004; VANNONI *et al.*, 2004; BARAL *et al.*, 2005). Estes estudos demonstraram que a adenosina-deaminase é um importante marcador da severidade da resposta inflamatória.

Camundongos deficientes da enzima adenosina-deaminase possuem níveis elevados de adenosina em vários tecidos, incluindo o pulmão e isso contribui para o desenvolvimento da inflamação pulmonar, com depósito de colágeno e formação de tecido fibrótico (CHUNN *et al.*, 2005a, b).

Em humanos, a deficiência genética da adenosina-deaminase resulta em severa linfopenia e imunodeficiência (BUCKLEY, 2004).

### **1.3.3. Mediadores do processo inflamatório**

#### **1.3.3.1. Óxido nítrico**

A vasodilatação que ocorre no processo inflamatório, induzida por diferentes agentes flogísticos (bradicinina, histamina, substância P, serotonina e trombina), é dependente da liberação de óxido nítrico (SICKER *et al.*, 2001; STOWE *et al.*, 2001; KARABUCAK *et al.*, 2005; WOTHERSPOON *et al.*, 2005; YOUSIF, 2005). O óxido nítrico é um gás solúvel derivado do metabolismo da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). O óxido nítrico está envolvido no relaxamento vascular, na inibição da agregação plaquetária, na neurotransmissão e nas atividades antimicrobiana e anti-tumoral dos macrófagos (DJUPESLAND *et al.*, 2001). Outros efeitos deletérios do óxido nítrico são decorrentes da ação citotóxica de alguns de seus metabólitos, como o peroxinitrito e os nitrosotióis. Estes metabólitos são capazes de lesar o ácido desoxirribonucléico (DNA), os lipídeos microbianos e as células vizinhas saudáveis, sendo esse o mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios observados em doenças auto-imunes (CUZZOCREA *et al.*, 2000; SZABÓ, 2003).

Atualmente são descritas três isoformas de NOS: NOS neuronal (NOS<sub>n</sub> ou NOS I), NOS endotelial (NOS<sub>e</sub> ou NOS III), ambas formas são constitutivas, ativadas fisiologicamente mantendo baixas concentrações de óxido nítrico e são dependentes de cálcio (CIRINO, FIORUCCI, SESSA, 2003). Já, a NOS induzida (NOS<sub>i</sub> ou NOS II)

é ativada em resposta a estímulos inflamatórios, como citocinas e fatores de crescimento, em células alvo liberando altos níveis de óxido nítrico durante a inflamação (ABRAMSON *et al.*, 2001).

Estudos identificaram a presença das três isoformas da NOS nas vias aéreas humanas (HACKEN *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 2002; MORRISSEY *et al.*, 2002). Além disso, estudos utilizando técnicas de biologia molecular e imunohistoquímica demonstraram um aumento do nível de NOS II em células epiteliais de pacientes asmáticos (GUO *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003a). Em cultura de células C6 de glioma de rato, a citocina pró-inflamatória TNF $\alpha$  aumentou a liberação de óxido nítrico, bem como a imunorreatividade para a NOSi, além do nível do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para NOSi (LEE *et al.*, 2003b).

A expressão de NOSi é regulada via fator de transcrição nuclear, dentre eles cita-se o fator de transcrição nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) (ALDERTON, COOPER, KNOWLES, 2001). Esta enzima pode ser induzida em células como macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, após estímulo por lipossacarídeos (LPS), citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6), entre outros (CHAN e FISCUS, 2004).

### **1.3.3.2. Citocinas**

As citocinas são fatores solúveis de baixo peso molecular, liberadas principalmente por células ativadas com a finalidade de mediar informações, bem como modular a função destas células por meio da ativação de receptores de superfície (DINARELLO, 2000; OPPENHEIM, 2001; HOLLOWAY, RAO, SHANNON, 2002). Como mediadores solúveis, sua função pode ser autócrina, parácrina ou sistêmica.

Estes mediadores são liberados por grande parte das células do organismo e tem uma variedade de funções (TYSON, CHEN, NOVAK, 2001; HOPKINS, 2003). O efeito biológico depende da citocina liberada e do tipo de célula envolvida. De um modo geral, as citocinas influenciam a ativação, a divisão, a apoptose e a quimiotaxia celular. Estas podem também estar envolvidas na diferenciação celular, na inflamação, na imunidade e no reparo tecidual (PARKIN e COHEN, 2001; HANADA e YOSHIMURA, 2002).

As citocinas são classificadas em subgrupos, como: interleucinas, fatores de crescimento, quemocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia ou ainda podem ser classificadas conforme sua atividade biológica como por exemplo: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  e TGF $\beta$ ) e antiinflamatórias (IL-1Ra, IL-4 e IL-10) (CAVAILLON, 2001; WONG *et al.*, 2003).

Dentre as células que produzem citocinas destacam-se os linfócitos T auxiliares que são divididos em duas subpopulações, TH1 e TH2 (MOSSMAN *et al.*, 1986). As células TH1 secretam principalmente IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , enquanto as células TH2 liberam IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (ROMAGNANI, 2000). As células do tipo TH1 estão envolvidas em processos inflamatórios, enquanto as do tipo TH2 regulam principalmente a produção de imunoglobulinas E, que são importantes na patogênese das doenças alérgicas (ROMAGNANI, 2000).

Dentre as principais citocinas que possui efeitos pró-inflamatórios destaca-se o TNF $\alpha$ . Este é produzido e liberado principalmente por macrófagos e também por linfócitos e mastócitos (ALVES e RIBEIRO, 2004). Esta citocina é um potente indutor do recrutamento de neutrófilos, no modelo de inflamação da bolsa de ar induzida por TNF $\alpha$ , em camundongos (SCHRAMM, LIU, THORLACIUS, 2000). Além disso, ela induz a expressão da molécula de adesão intracelular tipo 1 (ICAM-1) em cultura de células epiteliais de brônquios humanos (SUBAUSTE, CHOI, PROUD, 2001) e ainda aumenta os níveis de RNAm da proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) e da quemocina de neutrófilo (KC), no modelo da microscopia vital no músculo cremaster de camundongos tratados com TNF $\alpha$  (ZHANG *et al.*, 2001). O TNF $\alpha$  também está envolvido em diversas doenças pelo qual ocorre um processo inflamatório importante. Dentre elas cita-se a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SPIELMANN *et al.*, 2001), a espondilite anquilosante (DE KEYSER *et al.*, 2004), infarto agudo do miocárdio (TORRE-AMIONE, 2005), artrite reumatóide (LANGE *et al.*, 2005; SARZI-PUTTINIA *et al.*, 2005), entre outras.

A família da IL-1 é composta por duas cadeias ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e os receptores para esta família podem ser do tipo I ou II (IL-1R I e IL-1R II). As duas isoformas de IL-1, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , são sintetizadas no citoplasma de células de origem mesenquimal na forma de precursores (Pro-IL-1 $\alpha$  e Pro-IL-1 $\beta$ ), sendo que apenas a Pro-IL-1 $\alpha$  e as formas maduras (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) apresentam atividade (AREND, 2002). A IL-1 exerce papel importante na defesa do organismo contra microorganismos intracelulares

como o *Mycobacterium tuberculosis*. Estudos demonstraram que camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e que não expressam o gene para IL-1 têm o tempo de vida média reduzido (JUFFERMANS *et al.*, 2000). Esta citocina estimula a liberação de outras citocinas como IL-6, IL-8 e IL-13 em cultura de mastócitos humanos (CHI *et al.*, 2004) e também está envolvida na regulação da expressão de moléculas de adesão em cultura de células epiteliais de brônquios humanos (SUBAUSTE, CHOI, PROUD, 2001).

A IL-1Ra, é um antagonista natural do receptor da IL-1 e é secretada por monócitos e neutrófilos de humanos (CORVOL *et al.*, 2003; OLAS, *et al.*, 2005). Até o momento já foram descritas três isoformas intracelulares da IL-Ra: icIL-1Ra1, icIL-1Ra2 e icIL-1Ra3, e uma isoforma secretada: sIL-1Ra. Esta citocina pode se ligar aos dois tipos de receptores da IL-1 (IL-1R I e IL-1R II). Ao ligar-se ao receptor IL-1R I, esta bloqueia a atividade da proteína acessória ligada a este receptor (AcP) inibindo desta forma os efeitos da IL-1 (AREND, 2002).

As citocinas IL-1 e IL-1Ra têm sido estudadas em diversas patologias humanas como artrite, doença inflamatória intestinal, doenças pulmonares, renais, hepáticas, do pâncreas, do SNC, leucemia, câncer, osteoporose e diabetes (AREND, 2002).

Além disso, outras doenças de caráter inflamatório pelo qual ocorre o envolvimento da IL-1 $\beta$  têm sido descritas como a artrite reumatóide (IWAKURA, 2002; FLEISCHMANN, STERN, IQBAL, 2004), o infarto agudo do miocárdio (LONG, 2001) e ainda a inflamação em nível de SNC (BASU, KYLE KRADY, LEVISON, 2004), entre outras.

Outra família importante de citocinas são as quemocinas. Estas podem ser divididas em quatro subfamílias: CX3C, CXC, CC e C. A classificação, com base na sua estrutura, ocorre de acordo com o número de resíduos de cisteína conservados e a distância entre eles. Os grupos CX3C, CXC e CC têm quatro resíduos de cisteína enquanto o grupo C apresenta apenas dois. Os grupos CX3C e CXC apresentam três ou um aminoácido entre os dois primeiros resíduos de cisteína, respectivamente. Já o grupo CC, apresenta as duas primeiras cisteínas adjacentes. O grupo CXC ainda pode ser dividido em: ELR+ e ELR- segundo a presença ou não do aminoácidos arginina e leucina ligado ao ácido glutâmico na região amino-terminal (MURPHY *et al.*, 2000). Dentre os representantes da classe CXC pode-se citar: MIP-2 e KC que também são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos na



resposta inflamatória como, por exemplo, nos modelos da bolsa de ar e microscopia vital induzidos por MIP-2 ou KC, ambos modelos em camundongos (SCHRAMM, LIU, THORLACIUS, 2000; ZHANG *et al.*, 2001).

Esta família de citocinas também possui papel importante na inflamação. Dentre as principais doenças pelo qual as citocinas possuem um papel importante cita-se: a artrite reumatóide (ZOHAR, WILDBAUM, KARIN, 2006), a síndrome da doença respiratória aguda (STRIETER *et al.*, 2005), a inflamação em nível SNC (CHAVARRIA e ALCOCER-VARELA, 2004) e a dermatite atópica (PIVARCSI e HOMEY, 2005).

### **1.3.3.3. Cininas**

As cininas, a bradicinina e a lisil-bradicinina (calidina), são oligopeptídeos formados endogenamente. Inúmeros estudos farmacológicos e bioquímicos têm demonstrado o envolvimento destas substâncias em processos fisiopatológicos, acompanhados de lesão tecidual e/ou inflamação (ZHANG, ADNER, CARDELL, 2004).

Em humanos, as cininas são formadas a partir dos cininogênios,  $\alpha_2$ -globulinas de alto ou baixo peso molecular, ambas derivadas de um único gene (BLAIS *et al.*, 2000), por ação de cininogêneses. O principal local de síntese dos cininogênios é o fígado.

A cininogênase mais conhecida é a calicreína. Existem dois tipos de calicreínas, a plasmática e a tecidual. A calicreína plasmática é sintetizada no fígado e circula no sangue como um precursor inativo, na forma de pré-calicreína. A ativação do sistema calicreínas ocorre através de estímulos fisiopatológicos como trauma tecidual e inflamação (O'RIORDAN *et al.*, 2003). No plasma, a conversão da pré-calicreína para calicreína é catalisada pelo fator Hageman (fator XII da cascata de coagulação). Por sua vez, a calicreína plasmática age sobre o cininogênio de alto peso molecular liberando a bradicinina. De forma geral, a calicreína plasmática não participa das reações de conversão do cininogênio de baixo peso molecular para a formação da calidina (BLAIS *et al.*, 2000).

A ativação do sistema cininas-calicreína, pelo qual são considerados mediadores pró-inflamatórios estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos (MOREAU *et al.*, 2005). Além disso, o sistema cininas-calicreínas também

promove a ativação de outros sistemas como, por exemplo, renina-angiotensina, coagulação e sistema complemento (MOREAU *et al.*, 2005).

Em humanos, a bradicinina exerce diversos efeitos como a liberação de diversos mediadores da inflamação como prostanóides de diversos tipos celulares, citocinas (IL-1 e TNF $\alpha$ ) de macrófagos, além do óxido nítrico liberado das células endoteliais vasculares (SCHMAIER, 2000; ELIIS e FOZARD, 2002).

Regoli e Barabe propuseram em 1980, através de ensaios biológicos, a classificação de receptores da bradicinina em B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Atualmente muitos estudos avaliam a função destes receptores em vários modelos utilizando-se agonistas e antagonistas seletivos para este receptor. Outros estudos avaliaram a expressão dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> durante a inflamação das vias aéreas (CHRISTIANSEN *et al.*, 2002; ZHANG, ADNER, CARDELL, 2005).

A maioria das ações fisiológicas da bradicinina é mediada através da ativação de receptores do tipo B<sub>2</sub>. Estes receptores são constitutivos, amplamente distribuídos no organismo, incluindo o SNC de animais de várias espécies (FERREIRA *et al.*, 2002).

Os receptores B<sub>1</sub> estão restritos a alguns tecidos, como a musculatura lisa vascular (arterial e venosa de coelho), sendo que muitas vezes coexistem com os receptores B<sub>2</sub>. Os receptores B<sub>1</sub> já foram clonados em ratos, coelho, camundongo, cão e em humanos (RANSOM *et al.*, 2004). A des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e a lis-des-Arg<sup>10</sup>-bradicinina são os agonistas seletivos do receptor B<sub>1</sub> (LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005). A importância deste receptor, induzido em vários estados patológicos, tem sido enfatizada, uma vez que parece ser pouco freqüente a ocorrência da sua forma constitutiva. Admite-se, com raras exceções, que o receptor B<sub>1</sub> seja induzido em condições patológicas, como por exemplo, durante a inflamação crônica, lesão tecidual e em estados de hiperalgesia (MEDEIROS *et al.*, 2004). Parece que a produção/liberação local de citocinas pró-inflamatórias pode estar envolvida na regulação destes receptores durante a inflamação (PASSOS *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2005).

É importante comentar que este autacóide está envolvido também em diversas doenças inflamatórias principalmente aquelas de caráter crônico como: aterosclerose (HALKIN e KEREN, 2002; CHENG, VAPAATALO, MERVAALA, 2005), doenças inflamatórias do SNC (RODI *et al.*, 2005), pancreatite (LIDDLE e NATHAN, 2004), além do infarto agudo do miocárdio (WOLFRUM *et al.*, 2001), inflamação das

vias aéreas como asma brônquica e doença pulmonar obstrutiva crônica (LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005; CHUNG, 2005).

Desta forma, muitos estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver antagonistas seletivos para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para auxiliar no tratamento das doenças inflamatórias crônicas, cuja terapia ainda é ineficaz (SANTOS, CALIXTO, SOUZA, 2003; SHARMA e AL-DHALMAWI, 2003).

#### **1.3.3.4. Aminas vasoativas**

As aminas vasoativas mais importantes são a histamina e a serotonina. Estes mediadores encontram-se em estoques formados previamente nas células. A serotonina é considerada um dos principais mediadores da dor e da inflamação, é produzida pelas células enterocromafins da mucosa gastrointestinal e é absorvida pelas plaquetas, onde se encontra estocada (VOOG *et al.*, 2000).

A histamina é uma amina primária básica, sintetizada a partir da histidina pela ação da histidina descarboxilase e armazenada dentro de grânulos secretores nos mastócitos e basófilos (MARONE *et al.*, 2003). Em humanos, a histamina está armazenada em mastócitos e basófilos, células enterocromafins do trato gastrointestinal e nervos histaminérgicos no SNC (MacGLASHAN, 2003). Por muitos anos tem se observado a presença de histamina em linfócitos, monócitos e plaquetas humanas (MacGLASHAN, 2003).

Os receptores histaminérgicos (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>) pertencem à família de receptores acoplados a proteína G. A ativação do receptor H<sub>1</sub> está envolvida em eventos intracelulares caracterizados pelo aumento dos níveis de cálcio intracelular promovendo, por exemplo, a contração do músculo liso das vias aéreas, em humanos (L'HEUREUX *et al.*, 2001; KAWANO *et al.*, 2004). Já a ativação do receptor H<sub>2</sub> promove uma resposta intracelular caracterizada pela elevação dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) em experimentos *in vitro* utilizando células U-937 (linhagem celular de monócitos humanos) (DELGADO, FUENTES, FERNÁNDEZ-ALFONSO, 2003). A ativação deste receptor promove ainda a secreção de ácido gástrico em animais e em humanos (HORIE *et al.*, 2000; BAROCELLI e BALLABENI, 2003). A ativação dos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> também está relacionada ao aumento do cálcio e do AMPC intracelular (MacGLASHAN, 2003), além de promover o recrutamento de neutrófilos, no modelo da pleurisia induzida por zimozan, em camundongos (TAKESHITA *et al.*, 2003).

Os basófilos e os mastócitos humanos podem ser estimulados a liberar histamina. Basófilos podem ser encontrados no sítio da inflamação durante reações de hipersensibilidade tardia e na asma brônquica em humanos. Isto sugere que a histamina é liberada localmente por mastócitos e basófilos infiltrados, sendo um importante mediador endógeno na inflamação alérgica (MARONE *et al.*, 2003).

A histamina, portanto é um dos principais mediadores químicos envolvidos nas doenças alérgicas, principalmente na urticária crônicas (PAPADOPOULOU *et al.*, 2005). Além disso, este mediador também está envolvido na inflamação das vias aéreas por meio da ativação de seus receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> (TAYLOR-CLARK e FOREMAN, 2005).

#### **1.3.3.5. Taquicininas**

Em 1931, a primeira taquicinina (substância P) foi identificada por Von Euler e Gaddum, em extratos de cérebro e intestino de equinos. Já em 1953, Lembeck propôs o possível papel da substância P como um neurotransmissor e em 1974 Takahashi e colaboradores propuseram a sua participação na inflamação neurogênica.

As taquicininas são uma família de peptídeos liberados tanto em nível de SNC como no sistema nervoso periférico, além de sua interação com os sistemas cardiovascular e imunológico (LIU e BURCHER, 2005). Estes peptídeos têm sido isolados em diferentes espécies animais vertebrados e invertebrados (HOLMGREN e JENSEN, 2001; SATAKE *et al.*, 2003).

Em mamíferos as taquicininas são consideradas neurotransmissores que agem de forma parácrina ou endócrina, bem como neuroimunomoduladores dos sistemas nervoso central, gastrointestinal e cardiovascular (LIU e BURCHER, 2005).

Dentre os principais efeitos biológicos destes peptídeos destacam-se: vasodilatação, extravasamento plasmático, contração da musculatura lisa, secreção de muco e excitação das fibras nervosas sensoriais. Estes peptídeos também estão envolvidos em processos imunológicos, inflamatórios e na inflamação neurogênica (HARRISON e GEPPETTI, 2001; PENNEFATHER *et al.*, 2004).

Em mamíferos, as taquicininas são derivadas de genes denominados preprotaquicininas. Estes genes já foram reconhecidos e denominados de: PPT-A que origina a substância P, a neurocinina A e os neuropeptídeos  $\gamma$  e K, PPT-B que origina a neurocinina B (PENNEFATHER *et al.*, 2004) e PPT-C que, por sua vez,

origina a hemoquinina-1 e as endoquininas A-D (ZHANG *et al.*, 2000; KURTZ *et al.*, 2002; PAGE *et al.*, 2003). Este último gene já foi identificado em várias espécies e este origina a hemoquinina-1, em camundongos e em ratos, a endoquinina-1, em coelhos e a hemoquinina-1 e endoquininas A e B em humanos (PAGE, 2004).

Os receptores taquicinérgicos podem ser do tipo NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub> e estes são ativados preferencialmente pela substância P, neuroquinina A e neuroquinina B, respectivamente. Recentemente, foi demonstrado, em mamíferos, que as taquicininas hemoquinina e endoquinina agem preferencialmente em receptores do tipo NK<sub>1</sub>. Todos estes receptores são acoplados a proteína G (LIU e BURCHER, 2005).

Os receptores taquicinérgicos podem ser localizados no trato gastrointestinal, na musculatura lisa, no sistema cardiovascular, na glândula adrenal, na pele, no SNC, na bexiga e no pulmão (LIU e BURCHER, 2005). Nesses órgãos a ativação dos receptores taquicinérgicos promove: contração da musculatura lisa, secreção de muco, aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de neutrófilos, ativação do NFκB e liberação de citocinas como a MIP-2, entre outros (LECCI *et al.*, 2000; OKAYA *et al.*, 2004).

Estudos recentes demonstraram a presença de um quarto receptor para as taquicininas, o NK<sub>4</sub>. Este já foi descrito no cérebro e na medula espinhal de ratos (DONALDSON, HASKELL, HANLEY, 2001) Sabe-se que este receptor possui uma homologia estrutural e efeitos farmacológicos semelhantes ao do receptor NK<sub>3</sub> (LECCI *et al.*, 2000).

Evidências têm demonstrado que as taquicininas liberadas de fibras nervosas sensoriais possuem papel importante na angionênese (SEEGERS *et al.*, 2003). A substância P injetada na pele humana produz calor, rubor, dor e inchaço. Já na pele de rato, induz a vasodilatação. Estes efeitos são mediados pela ativação do receptor NK<sub>1</sub> (CAO *et al.*, 2000). Em condições experimentais, foi demonstrado que a substância P quando administrada por via intravenosa, causa vasodilatação em gatos e este efeito foi potencializado quando os animais foram tratados com L-NAME, inibidor da NOS, logo, a vasodilatação observada ocorre via mecanismo independente do endotélio vascular (HSU *et al.*, 2003). Além disso, em ratos tratados com antagonista para o receptor NK<sub>1</sub>, SR 1403333, ocorreu uma diminuição da permeabilidade vascular, dos níveis de TNFα e do recrutamento de neutrófilos

após isquemia/reperfusão, demonstrando assim o envolvimento deste mediador nesses eventos (SOUZA *et al.*, 2002).

As taquicininas de forma geral estão envolvidas na resposta inflamatória principalmente aquelas de caráter crônico e de origem neurogênica. Dentre as doenças pelo qual podemos observar o envolvimento das taquicininas destacam-se: pancreatite (LIDDLE e NATHAN, 2004), inflamação: do SNC (MARRIOTT, 2004), do trato respiratório, gastrointestinal e sistema muscular esquelético (O'CONNOR *et al.*, 2004), além da artrite reumatóide (KEEBLE e BRAIN, 2004).

#### 1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Esforços têm sido realizados no sentido de encontrar modelos experimentais e animais apropriados para cada tipo de reação inflamatória como asma brônquica, artrite reumatóide e retocolite ulcerativa. Esta necessidade se deve ao fato que a maioria das reações inflamatórias apresentam características comuns, mas sua etiologia e manifestações clínicas diferem significativamente. Protocolos experimentais, em que o processo inflamatório é induzido agudamente, têm sido utilizados para estudo da participação de mediadores químicos, diferentes tipos celulares e ainda possibilitam a seleção de fármacos/plantas com potencial atividade antiinflamatória.

Entre os métodos para o estudo do processo inflamatório e para a seleção de novos fármacos/plantas, citam-se: pleurisia, bolsa de ar, edema de pata, artrite e implantes de esponjas embebidas com agentes irritantes no subcutâneo (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985). No entanto, algumas técnicas apresentam limitações: dificuldades de manipulação durante a indução da inflamação e de quantificação dos parâmetros inflamatórios (edema, número e tipo de células envolvidas, extravasamento de proteínas, mediadores envolvidos).

O modelo da pleurisia foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1989). Este modelo possibilita a avaliação do extravasamento de líquido bem como a migração de células (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996; DALMARCO, FRÖDE, MEDEIROS, 2002, 2004) e ainda a participação de outros mediadores como: citocinas, enzimas e outros mediadores químicos pró-inflamatórios induzidos por diversos agentes flogísticos (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996; 1997; 1999;

FRÖDE-SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1999; DA CUNHA *et al.*, 2001; FRÖDE e MEDEIROS, 2001; FRÖDE, SOUZA, CALIXTO, 2002).

A intensidade e a duração da inflamação produzida por um agente flogístico dependerá da sua persistência no local e da natureza da sua interação com fatores humorais e/ou celulares. Dentre os agentes flogísticos que podem ser utilizados destaca-se a carragenina, obtido de algas marinhas. Este agente produz uma resposta inflamatória aguda no modelo da pleurisia em camundongos. Quatro horas após a administração da carragenina na cavidade pleural ocorre aumento da exsudação bem como de leucócitos do tipo polimorfonucleares (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996).

No modelo da pleurisia admite-se que o sítio primário da inflamação seja a microvasculatura subpleural, local onde se iniciará a exsudação e o influxo de células inflamatórias. A partir do processo inflamatório induzido experimentalmente, ocorre acúmulo de líquido, o qual pode apresentar características de exsudato, com ou sem fibrina, ou transudado. Os mediadores envolvidos neste tipo de inflamação são liberados por células residentes ou por aquelas que migram para o local do processo inflamatório.

Já o modelo da bolsa de ar tem seus primeiros relatos em ratos na década de 60 (OKUDAIRA e SCHUWARZ, 1962) e em camundongos nos anos 70 (CLARK, 1975). Neste modelo, a partir do lavado da bolsa de ar, também é viável a avaliação do extravasamento de líquido, a migração de células bem como a mensuração de enzimas como a ciclooxigenase e outros mediadores como óxido nítrico, prostaglandinas e leucotrienos, induzidos por diversos agentes flogísticos (DAWSON *et al.*, 1991; MARTIN *et al.*, 1994; POSADAS *et al.*, 2000). Neste modelo experimental os mediadores químicos são liberados também por células residentes ou por aquelas que migraram para o local da resposta inflamatória.

Outros agentes flogísticos como a bradicinina, a histamina ou a substância P também são importantes agentes que participam da resposta inflamatória promovendo aumento de leucócitos e/ou exsudação no local da lesão. Estes agentes são também utilizados para avaliar o mecanismo de ação antiinflamatório de novos fármacos e/ou de plantas.

As técnicas da pleurisia e do modelo da bolsa de ar possuem vantagens em relação à outras técnicas já citadas anteriormente pois a partir da coleta dos lavados da cavidade pleural e da bolsa de ar é possível analisar e quantificar diversos

parâmetros inflamatórios como celularidade, exsudação, mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico, entre outros), além da participação de enzimas como mieloperoxidase e adenosina-deaminase, sem a necessidade de recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem dos modelos citados é a sua fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos podem ser estudados.

Neste trabalho, optou-se pelos modelos experimentais da pleurisia e da bolsa de ar. A escolha destes modelos foi baseada em evidências já comentadas acima, destacando sua utilidade, servindo para o estudo da reação inflamatória, bem como avaliação dos extratos vegetais com potencial propriedades antiinflamatórias. Como citado, o volume de fluido extravasado, o acúmulo de células e os mediadores químicos que participam da reação podem ser quali e quantitativamente analisados.



## 2. JUSTIFICATIVA

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e por um longo período de tempo, minerais, produtos animais e plantas foram as principais fontes de moléculas biologicamente ativas (PHILLIPSON, 2001). Os compostos derivados de plantas possuem uma grande diversidade molecular e podem ser utilizados como modelo para a síntese de compostos mais ativos e/ou seletivos para o tratamento de determinada doença. Apesar dos avanços da área química e química farmacêutica, muitas substâncias ativas derivadas de plantas têm uma síntese complexa e muitas vezes com baixos rendimentos o que torna a produção industrial inviável economicamente (FRANÇA, 2001).

Nos últimos anos, há um crescente interesse em terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, para os mais diversos fins incluindo o tratamento de doenças inflamatórias. Isso se deve: a crise econômica, o alto custo dos medicamentos industrializados, a ineficiência da medicina convencional no tratamento de algumas doenças, uso abusivo e/ou incorreto de fármacos sintéticos podendo gerar sérios efeitos colaterais e ainda o difícil acesso da população à assistência médica (SCHENKEL, 1998; RATES, 2001).

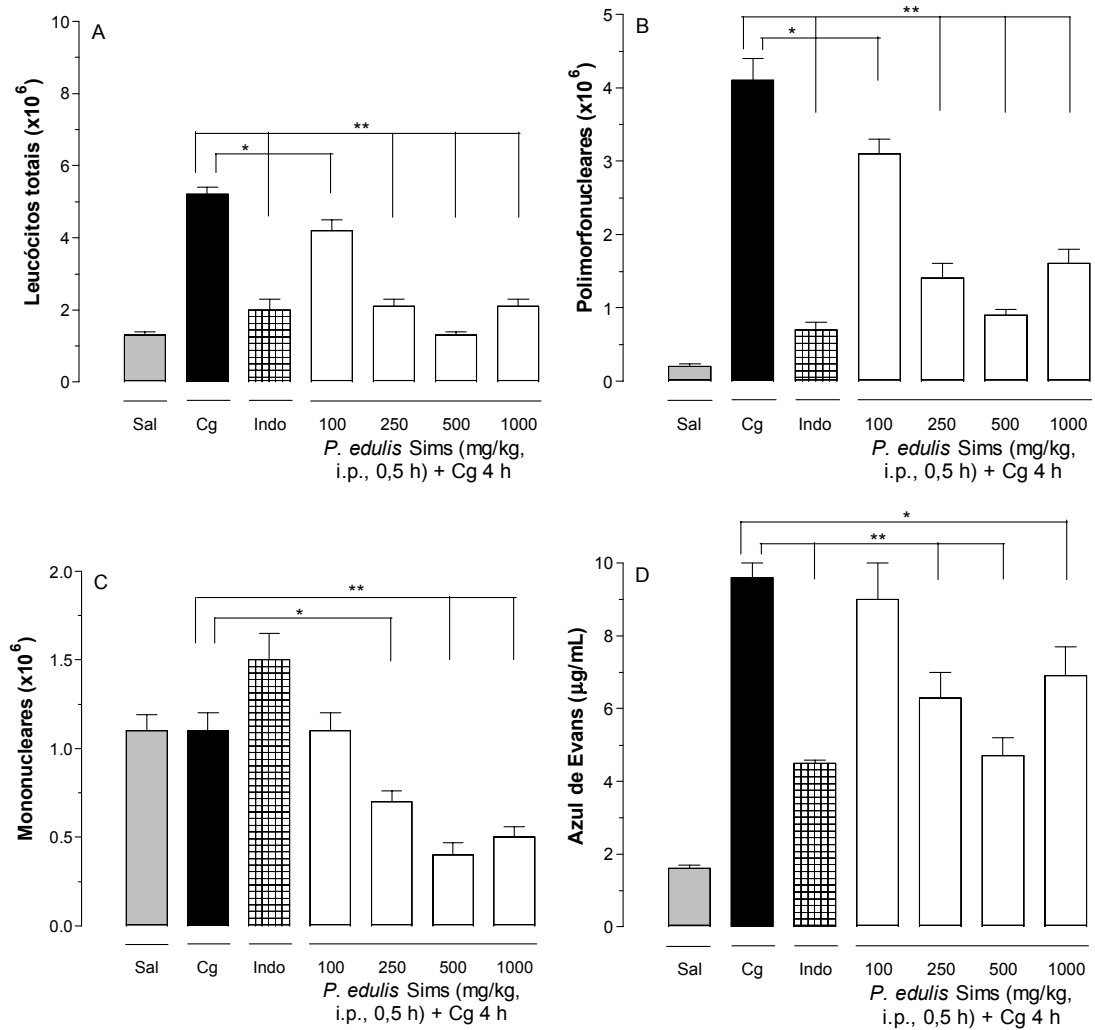
Um passo importante no estudo farmacológico é a seleção de uma planta. A escolha da espécie *Passiflora edulis* variação *flavicarpa* Degener, foi baseada na combinação de vários critérios. O gênero *Passiflora*, conhecido por suas atividades no SNC, também tem sido utilizado na medicina popular para o tratamento de diversos processos inflamatórios, como já citados anteriormente.

Estudos têm demonstrado a presença de flavonóides (PETRY *et al.*, 2001; DE-PARIS *et al.*, 2002), compostos com propriedades antiinflamatórias amplamente demonstradas (SAKATA *et al.*, 2003; UEDA, YAMAZAKI, YAMAZAKI, 2004). Segundo Borrelli e colaboradores (1996) a espécie *Passiflora incarnata* apresenta efeitos antiinflamatórios importantes. Portanto, o estudo do efeito antiinflamatório da espécie *Passiflora edulis* variação *flavicarpa* Degener se torna relevante.

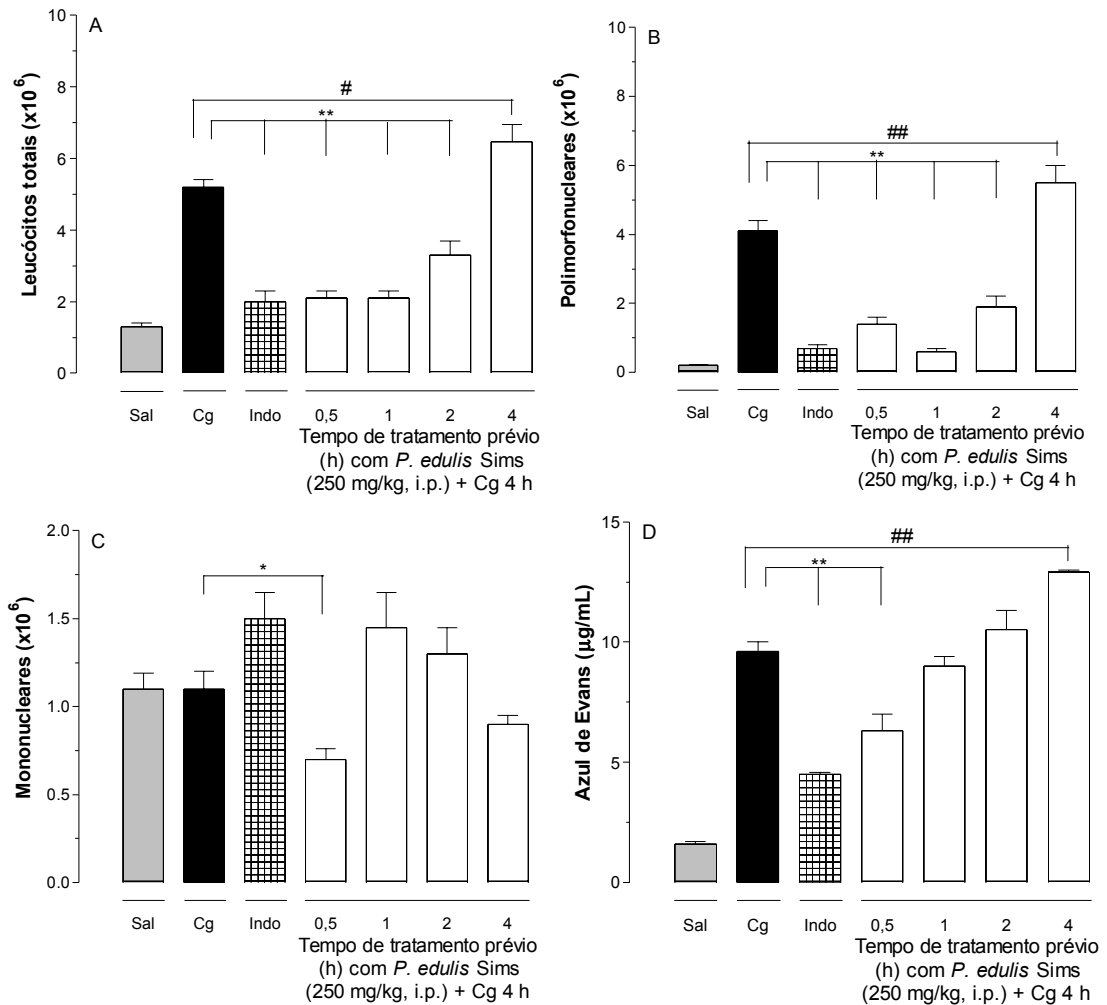
O estudo das plantas medicinais pode fornecer embasamento científico para a medicina popular que ainda é a única fonte terapêutica em grande parte da população com baixo poder sócio-econômico-social. Além disso, o uso de

medicamentos fitoterápicos movimentam milhões de reais anualmente (GARCIA *et al.*, 1996 apud GUERRA e NODARI, 2001).

Além disso, estudos sobre as curvas dose e tempo-resposta da *Passiflora edulis* Sims no modelo de inflamação da pleurisia induzida pela carragenina foram realizados em nosso grupo de pesquisa pelo mestrando Álvaro Vargas Jr. Este autor demonstrou que a *Passiflora edulis* Sims inibiu a migração de leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e ainda a exsudação na dose de 250 mg/kg de animal, quando administrada por via intraperitoneal, 0,5 h antes da carragenina (Figuras 1 e 2).



**Figura 1:** Efeito das diferentes doses do extrato *Passiflora edulis* Sims (100-1000 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, i.pl.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 5 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos (VARGAS, 2004).



**Figura 2:** Efeito do extrato *Passiflora edulis* Sims (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais somente tratados com salina estéril (NaCl 0,9%, i.pl.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Indo = Animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 5 a 10 animais e a barra vertical o e.p.m. \* ou #  $P < 0,05$  e \*\* ou ##  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e # e ## o aumento (VARGAS, 2004).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o mecanismo de ação antiinflamatório do extrato *Passiflora edulis* variação *flavicarpa* Degener, na resposta inflamatória induzida por diferentes agentes flogísticos (carragenina, bradicinina, histamina ou substância P) nos modelos da pleurisia e da bolsa de ar, em camundongos.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar o(s) extrato(s) obtidos das folhas, raízes ou pericarpo dos frutos maduros de *P. edulis* que apresentou melhor atividade antiinflamatória inibindo os leucócitos e/ou a exsudação, quando administrados por via intraperitoneal, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina;
- Estudar as curvas dose e tempo-resposta do extrato *P. edulis* folhas no modelo da bolsa de ar induzida pela carragenina, em camundongos;
- Estudar o mecanismo de ação antiinflamatória do(s) extrato(s) escolhido(s) anteriormente, analisando-se o efeito deste(s) sobre a atividade da mieloperoxidase, adenosina-deaminase, níveis de nitrato/nitrito, fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 beta, quemocina de neutrófilo e proteína inflamatória de macrófago 2 em dois modelos de inflamação: pleurisia e bolsa de ar induzidos pela carragenina;
- Verificar se o(s) extrato(s) escolhido(s) inibe(m) outros mediadores da inflamação (bradicinina, histamina e substância P) estudando-se o efeito deste(s) sobre a migração dos leucócitos e a exsudação no lavado pleural e da bolsa de ar de animais com inflamação induzida por estes agentes flogísticos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL BOTÂNICO

Os procedimentos referentes à obtenção e as análises dos extratos aquosos liofilizados da *Passiflora edulis* variação *flavicarpa* Degener (*P. edulis*) avaliados neste trabalho foram realizados por Silvana M. Zucolotto sob orientação do professor Dr. Eloir P. Schenkel, no Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC.

#### 4.1.1. Coleta e identificação

As folhas e os frutos de *P. edulis* foram coletadas na cidade de Antônio Carlos no Estado de Santa Catarina em junho de 2003. As raízes foram coletadas no mesmo local em outubro de 2003.

O material botânico foi caracterizado e identificado pelo professor Dr. Daniel Falkenberg do Departamento de Botânica da UFSC, Florianópolis/SC. A exsicata desta planta está depositada no herbário da UFSC, sob o número ICN 33886.

#### 4.1.2. Preparação dos extratos

As folhas e as raízes da *P. edulis* foram secas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor, durante duas semanas. Esses materiais vegetais foram triturados em moinho de facas (Maqmont Equipamentos, Brasil). O pericarpo (albedo e casca) dos frutos maduros foi utilizado *in natura* e picotado com auxílio de uma faca. Os extratos aquosos das folhas, raízes e pericarpo foram preparados por infusão, na proporção 1:10 (planta/solvente, p/v), sendo que os materiais vegetais foram deixados em contato com água fervente durante 10 min, filtrados e liofilizados (Edward® E-C Micromodulyo Freezer Dryer, EUA).

Todos os extratos obtidos foram analisados através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se como eluente solução de acetato de etila: ácido fórmico: água (na proporção de 80:10:10, v/v/v) e Reagente Natural A (1%) (revelador) (solução metanólica de difenilboriloxietilamina 1%). Amostras padrões de orientina, isorientina, vitexina e isovitexina foram utilizadas (Extrasynthèse, França). Utilizando-se a CCD, observou-se a presença de flavonóides C-glicosídeos, no extrato aquoso liofilizado das folhas. Além disso, foi identificado, neste extrato, o

predomínio de C-glicosilflavonas, orientina e isoorientina. No extrato aquoso liofilizado do pericarpo dos frutos maduros também foi observado, em menor quantidade, a presença de flavonóides C-glicosídeos. No extrato aquoso liofilizado das raízes não foi observada a presença desses compostos (ZUCOLOTTO, 2005).

#### 4.2. FÁRMACOS E REAGENTES

Na tabela 1 encontram-se os principais fármacos e reativos utilizados, suas procedências e sua utilização.

**Tabela 1:** Fármacos e reativos utilizados, suas procedência e usa utilização

Fármacos e reativos	Procedência	Utilização
Extratos aquosos liofilizados das folhas, raízes e pericarpo dos frutos maduros da <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> Degener	Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil	Pesquisa do efeito antiinflamatório
Carragenina (grau IV), Bradicinina, Histamina e Substância P	Sigma Chemical Co., St. Louis, CO, EUA	Agentes flogísticos
Dexametasone	Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil	Fármaco antiinflamatório esteroideal
Captopril	Ranbaxy Laboratories Ltd., Dewas Madhya Pradesh, Índia	Fármaco que inibe a ação de quininases
Türk	Newprov, Pinhais, PR, Brasil	Diluyente para leucócitos
May-Grünwald	Newprov, Pinhais, PR, Brasil	Corante para contagem diferencial dos leucócitos
Giemsa	Laborclin, Pinhais, PR, Brasil	Corante para contagem diferencial dos leucócitos
Azul de Evans	Acros-Organics, New Jersey, EUA	Corante que se liga a albumina plasmática
Mieloperoxidase de neutrófilos humanos	Sigma Chemical Co., St. Louis, CO, EUA	Enzima de leucócitos
Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%)	Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Quantificação de mieloperoxidase
Orto-dianisidina 2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina)	Sigma Chemical Co., St. Louis, CO, EUA	Quantificação de mieloperoxidase
Azida sódica	Riedel-de Haën, Alemanha	Quantificação de mieloperoxidase
Fosfato de sódio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Quantificação de mieloperoxidase, nitrato e nitrito

Sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> )	Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Desproteização das amostras
Formato de amônio (CH <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Acros-Organics, New Jersey, EUA	Quantificação de nitrato e nitrito
Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) e nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Fluka, Buchs, Suíça	Quantificação de nitrato e nitrito
Ácido fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Nuclear, Diadema, SP, Brasil	Quantificação de nitrato e nitrito
<i>Escherichia coli</i> (E.C. ATCC 25922) e sulfanilamida (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S)	Sigma Chemical Co., St. Louis, CO, EUA	Quantificação de nitrato e nitrito
Dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina (C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Alemanha	Quantificação de nitrato e nitrito
Hidróxido de sódio (NaOH)	Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Quantificação de nitrato, nitrito e adenosina-deaminase
Fosfato de sódio monohidratado (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Quantificação de adenosina-deaminase
Fosfato de hidrogênio dissódico dodecahidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O)	Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Quantificação de adenosina-deaminase
Sulfato de amônio (NH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> )	Synth, Diadema, SP, Brasil	Quantificação de adenosina-deaminase
Fenol (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH)	Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Quantificação de adenosina-deaminase
Nitroprussiato de sódio (C <sub>5</sub> FeN <sub>5</sub> Na <sub>2</sub> O.2H <sub>2</sub> O)	Nuclear, Diadema, SP, Brasil	Quantificação de adenosina-deaminase
Adenosina (C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> )	Fluka, Buchs, Suíça	Quantificação de adenosina-deaminase
Kit de Elisa com anticorpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ de camundongo	BD - Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA	Quantificação de TNF $\alpha$
Kit de Elisa com anticorpo de coelho anti-IL-1 $\beta$ de rato	IBL - Immuno Biological Laboratories Co. Ltd., Fujioka-city, Gunma, Japan	Quantificação de IL-1 $\beta$
Kit de Elisa com anticorpo de coelho anti-KC de camundongo	IBL - Immuno Biological Laboratories Co. Ltd., Fujioka-city, Gunma, Japan	Quantificação de KC
Kit de Elisa com anticorpo de coelho anti-MIP-2 de camundongo	IBL - Immuno Biological Laboratories Co. Ltd., Fujioka-city, Gunma, Japan	Quantificação de MIP-2

Elisa = enzimmunoensaio; IL-1 $\beta$  = interleucina 1 beta; KC = quimocina de neutrófilo; MIP-2 = proteína inflamatória de macrófago 2; TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa; var. = variação.

Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.



No dia dos experimentos, os extratos aquosos liofilizados da *P. edulis* foram dissolvidos em solução salina estéril, à temperatura ambiente.

#### **4.3. ANIMAIS**

No nosso estudo foram utilizados camundongos albinos suíços com 1 a 2 meses de idade, de ambos os sexos, pesando entre 18 a 30 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC.

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h, acondicionados em gaiolas de plástico (40 x 32 cm), sob temperatura ambiente (média de 25°C), com livre acesso à água e ração.

Os experimentos foram realizados entre 8 e 18 h e foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983) e normas estabelecidas pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFSC (número do protocolo: 299/CEUA e 23080.014518/2004-15/UFSC).

#### **4.4. PROCEDIMENTO ANESTÉSICO**

A anestesia foi induzida com pentobarbital (25 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.), a fim de possibilitar a administração da solução corante de azul de Evans (25 mg/kg, intraorbital, i.o.) com o objetivo de avaliarmos indiretamente a exsudação.

#### **4.5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS**

No modelo da pleurisia, os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital tendo em vista que o sacrifício por deslocamento cervical não é possível, uma vez que na execução deste procedimento ocorre sangramento para a cavidade pleural, o que inviabiliza a metodologia da pleurisia. Já no modelo da bolsa de ar, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

## 4.6. MÉTODOS

### 4.6.1. Modelos de inflamação aguda utilizados

- ***Inflamação induzida por diferentes agentes flogísticos no modelo da pleurisia, em camundongos***

Em diferentes grupos de animais induziu-se a pleurisia utilizando-se diferentes agentes flogísticos (carragenina, bradiginina, histamina ou substância P) conforme protocolos descritos na literatura por Saleh, Calixto, Medeiros (1996; 1997), Fröde-Saleh, Calixto, Medeiros (1999) e Da Cunha e colaboradores (2001), respectivamente. Os agentes flogísticos foram utilizados nas seguintes concentrações: carragenina (Cg: 1%, 0,1 mL/cavidade) (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996), bradiginina (BK: 10 nmol/cav.) (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1997), histamina (HIST: 100 µg/cav.) (DA CUNHA *et al.*, 2001) e substância P (SP: 20 nmol/cav.) (FRÖDE-SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1999).

Na pleurisia induzida pela BK, os animais foram tratados previamente com captopril (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da aplicação de BK para evitar a degradação da BK pelas quininas (CAMPOS e CALIXTO, 1995).

No dia dos experimentos, os animais receberam 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou do agente flogístico (Cg, BK, HIST ou SP) administrado na cavidade pleural direita através do espaço intercostal utilizando-se de uma agulha 13x5 mm e cânula de poliestireno. A análise da resposta inflamatória da pleurisia foi observada 4 h após a administração do agente flogístico. Os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital, foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, foi feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o apêndice xifóide foi pinçado e a cavidade pleural foi exposta. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada, com auxílio de pipeta automática, com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada (PBS: pH 7,6: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM) e heparinizada (20 UI/mL).

Para a avaliação indireta da exsudação os animais foram tratados com uma solução do corante azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.o.) 40 min antes da indução da pleurisia (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996; 1997; FRÖDE-SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1999; DA CUNHA *et al.*, 2001).

Os experimentos foram sempre acompanhados por controle positivo (animais tratados somente com um dos agentes flogísticos por via intrapleural, i.pl.). Controle

negativo (animais tratados somente com salina ou o veículo de diluição dos extratos estéreis, i.pl.). Controle de fármaco com efeito antiinflamatório (dexametasona: inibidor da fosfolipase A<sub>2</sub>, óxido nítrico sintetase induzida, ciclooxigenase-2 e fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, entre outros) na dose de 0,5 mg/kg (i.p.) administrado 0,5 h antes da pleurisia induzida por Cg, BK, HIST ou SP (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1997; 1999; FRÖDE-SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1999).

Na pleurisia induzida pela Cg os seguintes parâmetros foram estudados: migração leucocitária, exsudação, mieloperoxidase, óxido nítrico, adenosina-deaminase, fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 beta, quemocina de neutrófilo e proteína inflamatória de macrófago 2. Já na pleurisia induzida pela BK, HIST ou SP estudou-se apenas a migração de leucócitos e a exsudação.

- ***Inflamação induzida por diferentes agentes flogísticos no modelo da bolsa de ar, em camundongos***

Diferentes agentes flogísticos (Cg, BK, HIST ou SP) foram utilizados para induzir a inflamação em diferentes grupos de animais. Os agentes flogísticos foram utilizados nas seguintes concentrações: Cg (1%, 0,5 mL/cav.) (SIN *et al.*, 1997), BK (20 nmol/cav.), HIST (10  $\mu$ mol/cav.) e SP (40 nmol/cav.).

Na bolsa de ar induzida pela BK, os animais foram tratados previamente com captopril (5 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da aplicação de BK para evitar a ação das enzimas quininas sobre a BK (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1997).

Neste protocolo experimental, os animais receberam injeções de 1,5 mL de ar por via subcutânea (s.c.) por três dias alternados para a formação da bolsa de ar. No sexto dia foi administrado um dos agentes flogísticos (Cg, BK, HIST ou SP, s.c.). Após 23 h da indução da inflamação os animais receberam solução azul de Evans (25 mg/kg, i.o.) e após 1 h foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foram fixados em mesa cirúrgica, a bolsa de ar foi aberta e lavada, com auxílio de pipeta automática, com 1 mL de salina estéril tamponada (PBS - pH 7,6) e heparinizada (20 UI/mL).

No modelo da bolsa de ar induzida pela Cg os seguintes parâmetros foram estudados: migração leucocitária, exsudação, mieloperoxidase, óxido nítrico, adenosina-deaminase, fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 beta, quemocina

de neutrófilo e proteína inflamatória de macrófago 2. Já na bolsa de ar induzida pela BK, HIST ou SP estudou-se apenas a migração de leucócitos e a exsudação.

Neste protocolo experimental também foi utilizado controle positivo (animais tratados somente com um dos agentes flogísticos), controle negativo (animais tratados somente com 0,5 mL de salina ou o veículo estéreis de diluição dos extratos s.c.). Além disso, utilizou-se também a dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) administrada em duas doses, sendo a primeira 0,5 h antes da indução da inflamação e a segunda 12 h após esta indução.

#### **4.6.2. Técnicas utilizadas**

##### **4.6.2.1. Contagem total e diferencial de leucócitos nos lavados pleural e da bolsa de ar**

Para a contagem de leucócitos totais foi utilizado 20  $\mu$ L dos lavados da cavidade pleural e da bolsa de ar, diluídos 1:20 em solução de Türk, utilizando-se câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico comum (aumento 400 vezes).

Para a contagem diferencial, 50  $\mu$ L das alíquotas dos lavados pleural e da bolsa de ar foram utilizados para a confecção dos esfregaços celulares em citocentrífuga (Cytopro® citocentrífuga modelo: 7620, Wescor, Logan, Utah, EUA) e corados pelo método de MayGrünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada também em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células  $\times 10^6$ .

- **Coloração dos esfregaços celulares**

A metodologia consiste na coloração sucessiva com uma mistura de eosinato de azul-de-metileno (MayGrünwald) e de azul-eosina (Giemsa).

As lâminas contendo o sedimento dos lavados pleural e da bolsa de ar após centrifugação em citocentrífuga foram secas em posição horizontal à temperatura ambiente. Em suporte de coloração apropriado, as lâminas foram cobertas com 1 mL de corante May-Grünwald e mantidas em contato com o sedimento por 2 minutos. A seguir adicionou-se água deionizada (1 mL) nas lâminas, com auxílio de pipeta automática com capacidade de 1 mL. Após 3 min, o corante foi removido e cobriu-se a lâmina com corante Giemsa (diluído 1:20 em água deionizada) por 15 min. A

seguir, as lâminas foram lavadas em água deionizada e secas à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em número total de células  $\times 10^6$ .

#### **4.6.2.2. Determinação do exsudato nos lavados pleural e da bolsa de ar**

No dia dos experimentos, uma alíquota (200  $\mu\text{L}$ ) dos lavados pleural e da bolsa de ar foram reservadas para a determinação dos níveis de azul de Evans em leitor de Elisa (enzimaimunoensaio) (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por Saleh, Calixto, Medeiros (1996; 1997), Saleh e colaboradores (1998), Fröde-Saleh, Calixto, Medeiros (1999) e Da Cunha e colaboradores (2001). Para a quantificação dos níveis de azul de Evans, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,1-25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tiveram suas densidades óticas determinadas, e formulou-se uma equação da reta. Os valores das concentrações de azul de Evans foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### **4.6.2.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase nos lavados pleural e da bolsa de ar**

Neste grupo de experimentos, os animais não foram previamente tratados com o corante azul de Evans. Imediatamente após a sacrifício dos animais, amostras dos lavados pleural e da bolsa de ar de camundongos foram coletadas e imediatamente processadas para a quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO). Volumes de 40  $\mu\text{L}$  do lavado ou do padrão (MPO de neutrófilos humanos (0,7-140 mU/mL)) foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 360  $\mu\text{L}$  de sistema de incubação (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30  $\mu\text{L}$  de azida sódica (1%) (RAO *et al.*, 1993). A seguir, as amostras foram centrifugadas (50 x g, por 5 min) e o sobrenadante transferido para cubetas, para posterior leitura das densidades óticas (450 nm) em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Curvas-padrão com atividades conhecidas da MPO (0,7-140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos.

Os valores da atividade da MPO foram expressos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

#### **4.6.2.4. Determinação dos níveis de nitrato e nitrito nos lavados pleural e da bolsa de ar**

O óxido nítrico (NO) foi quantificado pela formação de seus metabólitos estáveis nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), utilizando-se a reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982; DI ROSA *et al.*, 1996). Neste grupo de experimentos, os animais não receberam tratamento prévio com o corante azul de Evans. As amostras dos lavados da cavidade pleural e da bolsa de ar foram coletadas, armazenadas em frascos eppendorf e estocadas em freezer a  $-20^\circ\text{C}$ . No dia dos experimentos, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e foram desproteinizadas adicionando-as hidróxido de sódio (2,5 N) e sulfato de zinco (10%). A seguir, 300  $\mu\text{L}$  dos lavados da cavidade pleural e da bolsa de ar foram diluídos em uma solução contendo formato de amônio (30  $\mu\text{L}$ ), fosfato de sódio (30  $\mu\text{L}$ ) e suspensão de *Escherichia coli* (EC ATCC 25922 (30  $\mu\text{L}$ ): diluída (1:10) em tampão PBS). A solução foi incubada durante 2 h, em estufa à  $37^\circ\text{C}$ , e a seguir, centrifugada (50 x g, por 5 min). Cerca de 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para uma cubeta, onde o mesmo volume de solução de Griess: sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) foi adicionado e incubado durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

A reação de  $\text{NO}_2^-$  com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada através da medida das densidades óticas em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) em 540 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  (0-150  $\mu\text{M}$ ) (Fluka, Buchs, Suíça) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrato/nitrito ( $\text{NO}^x$ ) em  $\mu\text{M}$ , com auxílio da equação da reta. (FRÖDE-SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1999).

#### **4.6.2.5. Determinação da atividade da adenosina-deaminase nos lavados pleural e da bolsa de ar**

Neste grupo de experimentos, os animais também não foram tratados com o corante azul de Evans. Inicialmente amostras com concentrações conhecidas

(volume final 2500  $\mu\text{L}$ ) de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (35 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15 mM) e  $\text{NH}_3\text{SO}_4$  (15 mM) foram preparadas com a finalidade de obtermos uma curva-padrão com atividades conhecidas (10-50 U/L). As amostras do fluido pleural e da bolsa de ar (20  $\mu\text{L}$ ) foram transferidas para cubetas e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de adenosina fosfato (pH 6,5, 500  $\mu\text{L}$ , composição:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (35 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Após período de incubação de 1 h a 37°C, a reação enzimática foi bloqueada pela adição da solução (1000  $\mu\text{L}$ ) de fenol (1 mM), nitroprussiato de sódio (0,17 mM) e tampão fosfato (1000  $\mu\text{L}$ : NaOCl: 11 mM) (GIUSTI e GALANTI, 1984). Esta solução também foi adicionada as cubetas contendo concentrações diferentes das amostras padrão (volume final 2500  $\mu\text{L}$ ). As absorbâncias das amostras foram lidas em 620 nm em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA).

A quantificação das atividades desconhecidas de adenosina-deaminase (ADA) foram expressas em U/L, com auxílio da equação da reta.

#### **4.6.2.6. Determinação dos níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2 nos lavados pleural e da bolsa de ar**

As seguintes citocinas foram quantificadas: fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ), interleucina 1 beta ( $\text{IL-1}\beta$ ), quemocina de neutrófilo (KC) e proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2) nos lavados pleural e da bolsa de ar utilizando kits de Elisa (BD - Biosciences Pharmingen e IBL - Immuno Biologica Laboratories). Os animais, neste grupo de experimentos, não receberam tratamento com corante azul de Evans. As amostras dos lavados da cavidade pleural e da bolsa de ar foram coletadas e as análises processadas de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação dos níveis de  $\text{TNF}\alpha$  foi realizada utilizando-se a técnica de Elisa fase sólida, método *sandwich*. Desta forma, diluiu-se as amostras dos lavados pleural e da bolsa de ar com solução diluente (salina tamponada contendo 0,09% de azida sódica) (1:2) incubando-se 50  $\mu\text{L}$  de amostra com 50  $\mu\text{L}$  de diluente na placa de Elisa contendo anticorpo monoclonal anti- $\text{TNF}\alpha$  fixado por 2 h em temperatura ambiente. Após este período a placa foi lavada com solução tampão de lavagem (solução detergente com 0,02% de timerosal) em lavadora de Elisa (Organon-Teknika, Washer 430, New Jersey, EUA). A seguir, anticorpo secundário policlonal

anti-TNF $\alpha$  de camundongo (100  $\mu$ L) foi adicionado e incubado por 1 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada com solução tampão de lavagem. Cem microlitos de conjugado enzimático (imunoglobulina do tipo IgG ligado ao complexo enzimático avidina-peroxidase contendo 0,01% de timerosal) foi incubado por 30 min a temperatura ambiente. Novamente procedeu-se a lavagem da placa utilizando-se o tampão de lavagem. Finalmente 100  $\mu$ L de substrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina: TMB) foi adicionado a placa de Elisa e incubado por 30 min a temperatura ambiente. A seguir, 100  $\mu$ L de solução bloqueadora de reação enzimática (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M) foi adicionada com a finalidade de proceder a leitura. Em paralelo curvas-padrão com concentrações conhecidas de TNF $\alpha$  (31,3-2000 pg/mL) foram também utilizadas. Quando necessário, as amostras dos controles e dos lavados pleural e da bolsa de ar foram diluídas previamente (1:3) em solução diluente (soro animal com 0,09% de azida sódica).

Para as dosagens quantitativas de IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2 utilizou-se a técnica de Elisa de fase sólida, método *sandwich*. Em diferentes placas Takatsy Sever foram adicionadas 100  $\mu$ L de cada amostra nas respectivas escavações da placa de Elisa contendo um dos anticorpos (anti-IL-1 $\beta$ , anti-KC ou anti-MIP-2) fixado. Estas foram incubadas por 1 h a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas com solução tampão de lavagem (tampão fosfato contendo 0,05% de Tween 20) em lavadora de Elisa (Organon-Teknika, Washer 430, New Jersey, EUA). Então, adicionou-se 100  $\mu$ L dos conjugados enzimáticos (imunoglobulina do tipo IgG com afinidade para a fração Fab dos respectivos anticorpos anti-IL-1 $\beta$ , anti-KC ou anti-MIP-2 mais a enzima peroxidase). Esta mistura foi incubada por 30 min a 4°C. Novamente a placa foi lavada utilizando-se tampão de lavagem. A seguir, adicionou-se substrato (TMB, 100  $\mu$ L). Após 30 min à temperatura ambiente adicionou-se 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N e a leitura foi realizada. Neste protocolo experimental foram também utilizadas curvas-padrão com concentrações conhecidas de: IL-1 $\beta$  (100-6400 pg/mL), KC (23,44-1500 pg/mL) e MIP-2 (1-64 pg/mL). Quando necessário as amostras dos controles ou dos lavados pleural e da bolsa de ar dos animais tratados foram diluídas em PBS contendo 1% de soro albumina bovina e 0,05% de Tween 20.

As leituras de todas as citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) a 450 nm.



As sensibilidades identificadas nos kits de Elisa foram: TNF $\alpha$  5 pg/mL, IL-1 $\beta$  1,67 pg/mL, KC 1,27 pg/mL e MIP-2 0,36 pg/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra e inter ensaios observados nos kits foram: TNF $\alpha$ : CV intra = 7,83 $\pm$ 0,90%; CV inter = 9,56 $\pm$ 2,08%, IL-1 $\beta$ : CV intra = 6,20 $\pm$ 0,40%; CV inter = 5,10 $\pm$ 0,57%, KC: CV intra = 9,67 $\pm$ 0,96%; CV inter = 4,10 $\pm$ 0,94% e MIP-2: CV intra = 10,87 $\pm$ 5,78%; CV inter = 4,87 $\pm$ 0,90%. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina, TNF $\alpha$  (31,3-2000 pg/mL), IL-1 $\beta$  (100-6400 pg/mL), KC (23,44-1500 pg/mL) e MIP-2 (1-64 pg/mL), também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. Os valores de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2) foram expressos em pg/mL.

#### 4.6.3. Protocolo experimental

##### 4.6.3.1. Triagem dos extratos de *P. edulis* (folhas, raízes e pericarpo), avaliando-se seus efeitos sobre a migração de leucócitos e a exsudação na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia

Inicialmente realizaram-se curvas dose-resposta para cada extrato em estudo no modelo da pleurisia induzida pela Cg. Desta forma diferentes grupos de animais foram tratados previamente (0,5 h) da Cg, com extratos de *P. edulis* folhas (100-500 mg/kg, i.p.), *P. edulis* raízes (100-500 mg/kg, i.p.) ou *P. edulis* pericarpo (100-500 mg/kg, i.p.). Os leucócitos e a exsudação foram avaliados 4 h após (Figura 3).

Estudos prévios realizando-se a curva dose-resposta (100-1000 mg/kg, i.p.) para o extrato obtido das folhas da *P. edulis* Sims demonstraram que a dose de 250 mg/kg (i.p.) foi a mais efetiva em inibir a migração dos leucócitos e os polimorfonucleares dos animais com pleurisia induzida pela Cg (VARGAS, 2004). Além disso, o estudo da curva tempo-resposta (0,5-4 h) demonstrou também que a *P. edulis* Sims inibiu os leucócitos e os polimorfonucleares quando administrada 0,5 h antes da Cg (leucócitos ( $\times 10^6$ ): Sal: 1,30 $\pm$ 0,10; Cg: 5,20 $\pm$ 0,20; 250 mg/kg: 2,10 $\pm$ 0,20; % de inibição: 60 $\pm$ 5. Polimorfonucleares ( $\times 10^6$ ): Sal: 0,20 $\pm$ 0,03; Cg: 4,10 $\pm$ 0,30; 250 mg/kg: 1,40 $\pm$ 0,20; % de inibição: 66 $\pm$ 4) ( $P < 0,01$ ) (VARGAS, 2004).

Apesar deste nosso trabalho utilizamos a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*, os resultados realizados com a curva dose e tempo-resposta para esta espécie também coincidem com estes resultados obtidos anteriormente por Vargas (2004) pelo qual avaliou-se a *P. edulis* Sims. Desta forma, a *P. edulis* var. *flavicarpa* foi efetiva em

inibir os leucócitos na dose de 250 mg/kg (i.p.) e no tempo de tratamento prévio de 0,5 h antes de Cg.

#### **4.6.3.2. Inflamação induzida por diferentes agentes flogísticos no modelo da pleurisia**

Com estes resultados obtidos o próximo passo foi estudar o mecanismo de ação antiinflamatório do extrato escolhido (*P. edulis* folhas) utilizando a melhor dose (250 mg/kg, i.p.) e o melhor período de tratamento prévio (0,5 h).

Para este fim estudou-se o efeito deste extrato sobre a atividade da MPO, ADA, níveis de NO, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2 na pleurisia induzida pela Cg. Além disso, estudou-se também o efeito deste extrato sobre os níveis de leucócitos e exsudação na pleurisia induzida pela BK, HIST ou SP. Este último protocolo experimental foi realizado com a finalidade de estudar o efeito do extrato na inibição de mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela quimiotaxia celular e formação de edema (BK, HIST e SP) (Figura 3).

As análises de leucócitos e exsudação foram realizadas segundo as técnicas descritas nos itens 4.6.2.1. e 4.6.2.2., respectivamente.

#### **4.6.3.3. Inflamação induzida por diferentes agentes flogísticos no modelo da bolsa de ar**

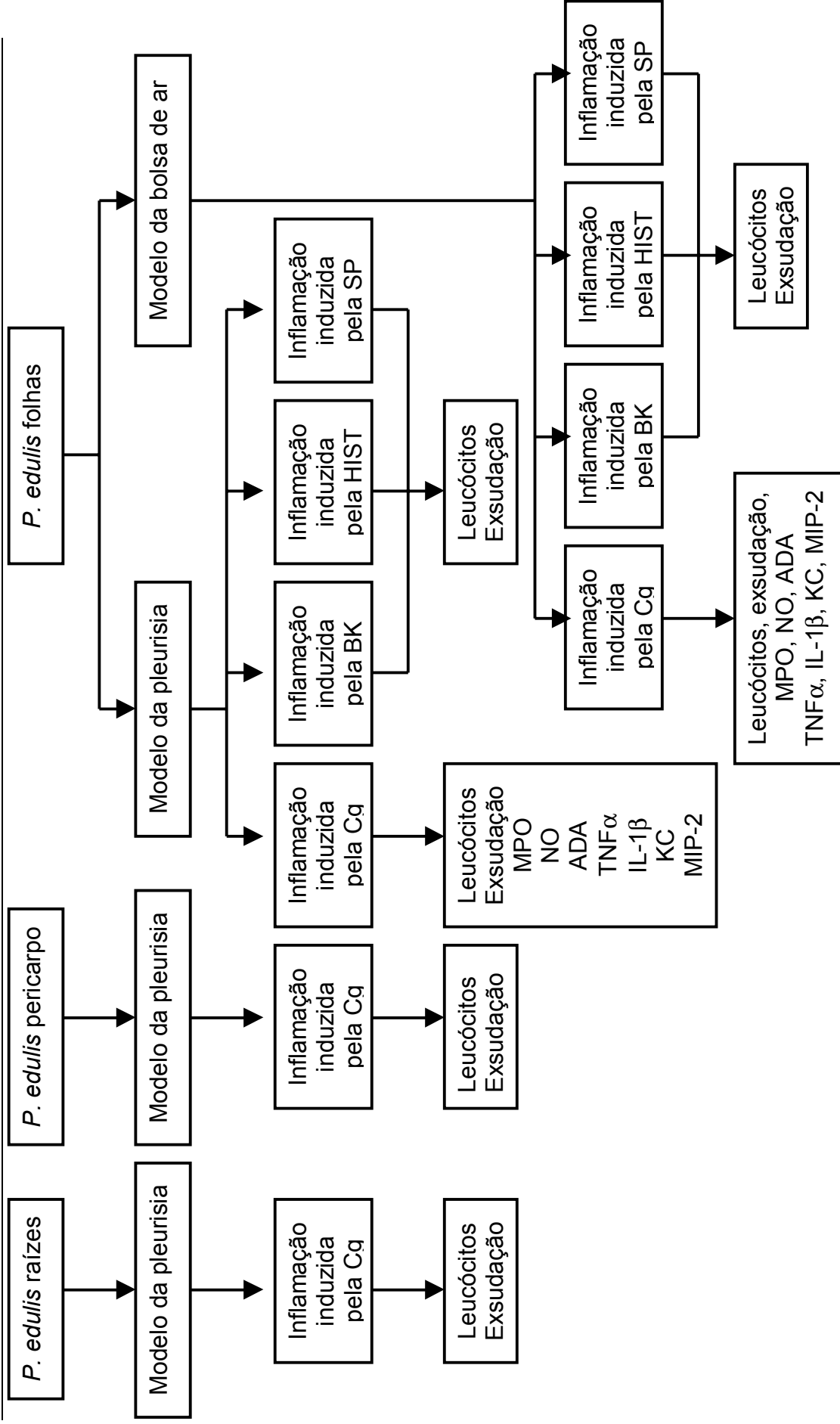
Para comprovar o efeito antiinflamatório do extrato *P. edulis* folhas outro modelo de resposta inflamatória aguda foi estudado: a bolsa de ar.

Assim, uma curva dose-resposta também foi realizada neste modelo de inflamação para verificar a dose do extrato pelo qual se obtém o melhor efeito inibitório sobre a migração de leucócitos e exsudação. Diferentes grupos de animais foram tratados previamente (0,5 h) com diferentes doses do extrato *P. edulis* folhas (50-500 mg/kg, i.p.) e os parâmetros já mencionados foram quantificados no lavado de bolsa de ar 24 h após a indução da inflamação.

Após a escolha da melhor dose que inibiu o influxo de leucócitos e/ou exsudação estudou-se o perfil temporal do extrato para avaliar o melhor tempo de tratamento prévio. Diferentes grupos de animais foram tratados previamente com uma das doses anteriormente estudadas de *P. edulis* folhas em diferentes períodos de tempo (0,5 a 4 h) antes da administração de Cg. Os mesmos parâmetros inflamatórios (migração de leucócitos e exsudação) foram estudados 24 h após.

Após a escolha da melhor dose e tempo de tratamento prévio, nos próximos experimentos, estudou-se o efeito da *P. edulis* folhas sobre a atividade da MPO, ADA, níveis de NO, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2 no modelo da bolsa de ar induzida pela Cg e os leucócitos e exsudação na bolsa de ar induzida pela BK, HIST ou SP (Figura 3).

As análises de leucócitos e exsudação foram realizadas conforme metodologias descritas nos itens 4.6.2.1. e 4.6.2.2., respectivamente.



**Figura 3:** Estudo dos efeitos antiinflamatórios dos diferentes extratos de *P. edulis* (folhas, raízes e pericarpio) nos modelos da pleurisia e da bolsa de ar. ADA = adenosina-deaminase; BK = bradicinina; Cq = carragenina; HIST = histamina; IL-1 $\beta$  = interleucina 1 beta; KC = quemoquina de neutrófilo; MIP-2 = proteína inflamatória de macrófago 2; MPO = mieloperoxidase; NO = óxido nítrico; *P. edulis* = *Passiflora edulis* variação *flavicarpa*; SP = substância P; TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa.

#### **4.6.3.4. Efeito do extrato *P. edulis* folhas, sobre a atividade da mieloperoxidase, níveis de óxido nítrico e atividade da adenosina-deaminase na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia**

Neste protocolo experimental foi investigado o efeito do extrato de *P. edulis* folhas sobre a atividade da MPO e ADA e níveis de NO<sup>x</sup>, no lavado da cavidade pleural de camundongos com pleurisia induzida pela Cg. O extrato foi administrado na dose de 250 mg/kg (i.p.) 0,5 h antes da indução da pleurisia e após 4 h os animais foram sacrificados e analisados os parâmetros inflamatórios (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1999; FRÖDE e MEDEIROS, 2001).

As análises da MPO, NO<sup>x</sup> e ADA foram avaliadas segundo as metodologias descritas nos itens 4.6.2.3., 4.6.2.4. e 4.6.2.5., respectivamente.

#### **4.6.3.5. Efeito do extrato *P. edulis* folhas, sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2 na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia**

Neste protocolo experimental investigou-se o efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre os níveis de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2), no lavado da cavidade pleural de camundongos com pleurisia. Os animais receberam o extrato na dose de 250 mg/kg (i.p.) 0,5 h antes da administração de Cg e após 4 h os animais foram sacrificados e realizou-se as quantificações das citocinas citadas.

A quantificação das citocinas citadas a cima foram realizadas segundo as metodologias descritas no item 4.6.2.6..

#### **4.6.3.6. Efeito do extrato *P. edulis* folhas, sobre a migração de leucócitos e exsudação na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da pleurisia**

Neste modelo investigou-se o efeito de *P. edulis* folhas na inflamação induzida por BK, HIST e SP. Para isso, diferentes grupos de animais foram tratados com uma dose de *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes inflamação. A seguir, a pleurisia foi induzida por um dos diferentes agentes flogísticos (BK, HIST ou SP). Os parâmetros da inflamação (migração de leucócitos e exsudação) foram avaliados 4 h após.

As análises de leucócitos e exsudação foram realizadas conforme descrito nos itens 4.6.2.1. e 4.6.2.2., respectivamente.

#### **4.6.3.7. Efeito do extrato *P. edulis* folhas, sobre a migração de leucócitos e exsudação na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar**

Neste protocolo experimental uma curva dose-resposta foi realizada para verificar a dose de extrato *P. edulis* folhas o qual inibiu a migração de leucócitos e a exsudação. Assim, diferentes grupos de animais foram tratados previamente (0,5 h) com diferentes doses do extrato *P. edulis* folhas (50-500 mg/kg, i.p.) e os leucócitos e exsudação foram quantificados no lavado de bolsa de ar 24 h após a indução da inflamação. Para avaliação da exsudação os animais foram tratados com solução corante azul de Evans (25 mg/kg, i.o.) 1 h antes do sacrifício.

Após a escolha da melhor dose realizou-se uma curva tempo-resposta para avaliar o melhor tempo de tratamento prévio. Diferentes grupos de animais foram tratados com uma dose de *P. edulis* folhas, daquelas estudadas anteriormente, em diferentes períodos de tempo (0,5 a 4 h) antes da administração de Cg. A migração de leucócitos e exsudação foram estudadas 24 h após.

As quantificações de leucócitos e exsudação foram realizadas conforme descrito nos itens 4.6.2.1. e 4.6.2.2., respectivamente.

#### **4.6.3.8. Efeito do extrato *P. edulis* folhas, sobre a atividade da mieloperoxidase, níveis de óxido nítrico e atividade da adenosina-deaminase na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar**

Nesta etapa investigou-se o efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre a atividade da MPO e ADA e níveis de NO<sup>x</sup> no lavado da bolsa de ar de camundongos inflamados. O extrato de *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) foi administrado 0,5 h antes da indução da inflamação. A quantificação dos parâmetros citados foi realizada 24 h após.

As análises de MPO, NO<sup>x</sup> e ADA foram realizadas segundo as metodologias descritas nos itens 4.6.2.3., 4.6.2.4. e 4.6.2.5., respectivamente.

#### **4.6.3.9. Efeito do extrato *P. edulis* folhas, sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2 na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar**

Neste protocolo experimental, o efeito do extrato de *P. edulis* folhas sobre os níveis de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2) foi investigado no lavado da bolsa de ar de camundongos inflamados. Sendo assim, os animais receberam *P. edulis* (100 mg/kg, i.p.) 0,5 h antes da indução da inflamação e foram sacrificados 24 h após.

As análises das citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2 foram realizadas segundo as metodologias descritas no item 4.6.2.6..

#### **4.6.3.10. Efeito do extrato *P. edulis* folhas, sobre a migração de leucócitos e exsudação na inflamação induzida por bradicinina, histamina ou substância P no modelo da bolsa de ar**

Os efeitos de *P. edulis* folhas sobre os níveis de leucócitos e exsudação na inflamação induzida por BK, HIST ou SP, foram investigados neste protocolo experimental. Para isso, diferentes grupos de animais foram tratados com *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrada 0,5 h antes inflamação. A seguir, a infamação foi induzida por um dos diferentes agentes flogísticos (BK, HIST ou SP). Os parâmetros inflamatórios (migração de leucócitos e exsudação) foram avaliados 24 h após.

As análises de leucócitos e exsudação foram realizadas conforme descrito nos itens 4.6.2.1. e 4.6.2.2., respectivamente.

### **4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados (migração celular, exsudação, MPO, NO<sup>x</sup>, ADA, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2) foram expressos através da média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e tratados com extrato foram realizados por meio do teste de variância ANOVA (teste paramétrico), complementado pelo teste de Dunnett. Quando necessário utilizou-se o teste “t” de Student (não-pareado).

Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

## 5. RESULTADOS

Devido à avaliação de diferentes extratos de *P. edulis* (folhas, raízes e pericarpo), em diferentes modelos de inflamação, os resultados foram mostrados em duas etapas. Primeiramente foram demonstrados os resultados obtidos no modelo da pleurisia induzida por diferentes agentes flogísticos e posteriormente os resultados obtidos no modelo da bolsa de ar também induzida por diferentes agentes flogístico.

### 5.1. RESULTADOS OBTIDOS NO MODELO DA PLEURISIA

#### 5.1.1. Triagem dos extratos de *P. edulis* (folhas, raízes e pericarpo) avaliando-se seus efeitos sobre a migração de leucócitos e a exsudação, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia

Neste protocolo experimental, o extrato aquoso liofilizado de *P. edulis* pericarpo quando administrado nas doses de 100-500 mg/kg (i.p.) 0,5 h antes da pleurisia induzida pela Cg 4 h, não foi efetivo em inibir significativamente a migração de leucócitos, de polimorfonucleares (PMN) e a exsudação para a cavidade pleural dos animais com pleurisia quando comparados ao grupo-controle (animais tratados com Cg) ( $P > 0,05$ ) (Figuras 4A, 4B e 4D). Por outro lado, as doses de 250 e 500 mg/kg (i.p.) 0,5 h aumentaram significativamente a migração de mononucleares (MONO) ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,14 \pm 0,07$ ; Cg:  $1,34 \pm 0,11$ ; 250 mg/kg:  $2,36 \pm 0,42$ ; 500 mg/kg:  $2,11 \pm 0,29$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 4C). Os percentuais de inibição ou aumento estão listados na tabela 2.

Em relação ao extrato *P. edulis* raízes as doses de 250 e 500 mg/kg (i.p.) administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia, promoveu inibição significativa da migração de leucócitos na cavidade pleural dos animais inflamados ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,32 \pm 0,08$ ; Cg:  $6,37 \pm 0,25$ ; 250 mg/kg:  $4,70 \pm 0,30$ ; 500 mg/kg:  $4,60 \pm 0,41$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 5A). Esta inibição se deu às custas da inibição de PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,18 \pm 0,03$ ; Cg:  $4,98 \pm 0,29$ ; 100 mg/kg:  $1,40 \pm 0,34$ ; 250 mg/kg:  $1,25 \pm 0,50$ ; 500 mg/kg:  $0,21 \pm 0,05$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 5B). Nas mesmas condições experimentais, este extrato aumentou de maneira significativa os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,14 \pm 0,07$ ; Cg:  $1,34 \pm 0,11$ ; 100 mg/kg:  $4,01 \pm 0,44$ ; 250 mg/kg:  $3,45 \pm 0,37$ ; 500 mg/kg:  $4,39 \pm 0,39$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 5C). Este extrato não foi capaz de inibir a exsudação ( $P > 0,05$ ) (Figura



5D). Os percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, PMN, MONO e exsudação estão listados na tabela 2.

Em relação ao extrato de *P. edulis* folhas os resultados obtidos foram os mesmo que Vargas Jr. (2004) obteve no estudo das curvas dose e tempo-resposta em sua dissertação de mestrado. O extrato obtido das folhas de *P. edulis* Sims foi efetivo em inibir a migração de leucócito na dose de 250 mg/kg (i.p.) quando administrado 0,5 h antes da Cg, sendo que esta inibição ocorreu às custas de uma inibição na migração de PMN e MONO (VARGAS Jr, 2004). Porém, não se observou a inibição da exsudação (resultados não mostrados).

A partir destes resultados foi escolhido o extrato de *P. edulis* folhas na dose de 250 mg/kg (i.p.) administrada 0,5 h antes da Cg. Isto porque este foi o mais eficaz inibindo, em menor dose, a inflamação (migração de leucócitos).

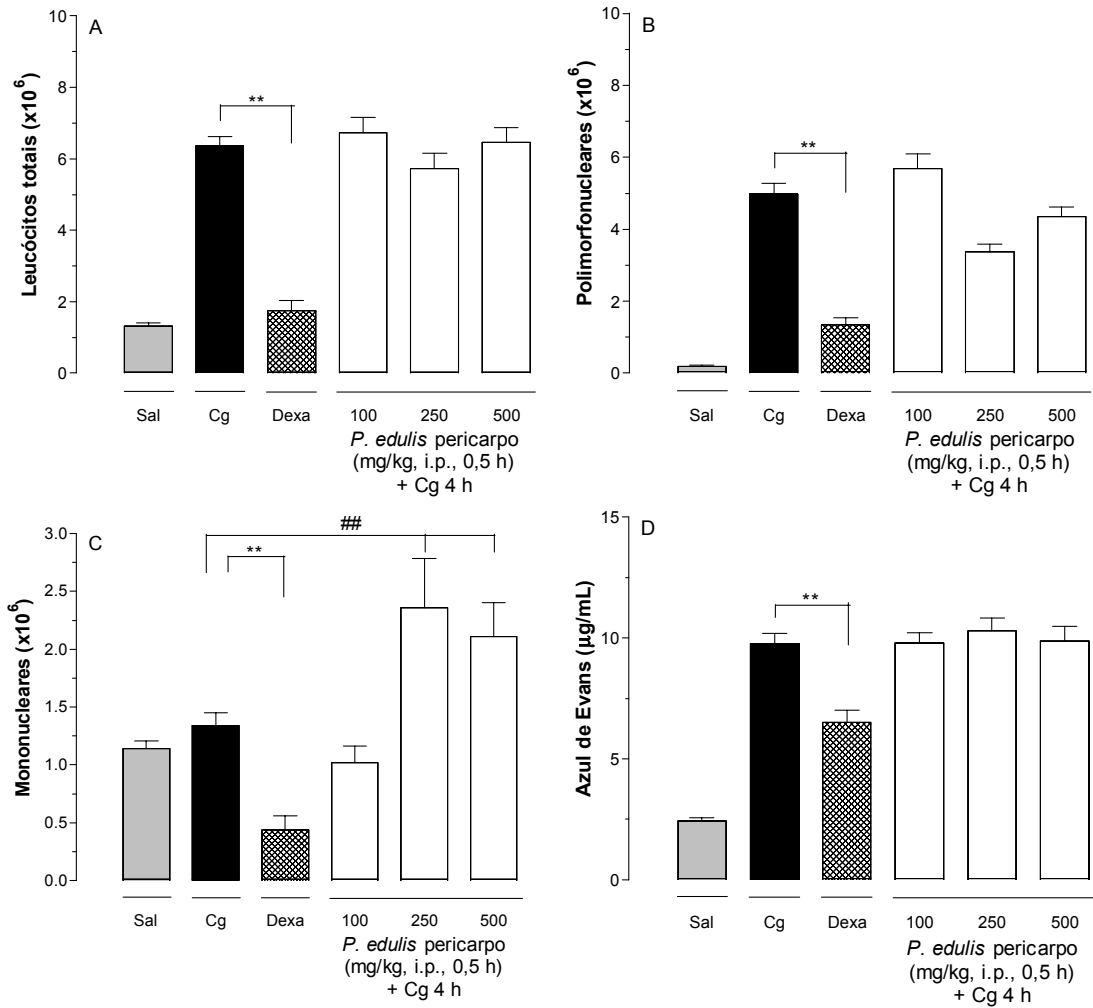
É importante ressaltar que nenhum extrato estudado (*P. edulis* folhas, raízes e pericarpo) foi efetivo em inibir a exsudação ( $P > 0,05$ ) (Figuras 4D e 5D) (Tabela 2).

A dexametasona (Dexa) (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h), inibiu significativamente a migração de leucócitos ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,32 \pm 0,08$ ; Cg:  $6,37 \pm 0,25$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $1,75 \pm 0,29$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figuras 4A e 5A), PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,18 \pm 0,03$ ; Cg:  $4,98 \pm 0,29$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $1,33 \pm 0,21$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figuras 4B e 5B), MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,14 \pm 0,07$ ; Cg:  $1,34 \pm 0,11$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,44 \pm 0,12$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figuras 4C e 5C) e exsudação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sal:  $2,42 \pm 0,14$ ; Cg:  $9,77 \pm 0,42$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $6,51 \pm 0,49$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figuras 4D e 5D). Os percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros estudados: leucócitos, PMN, MONO e exsudação estão listados na tabela 2.

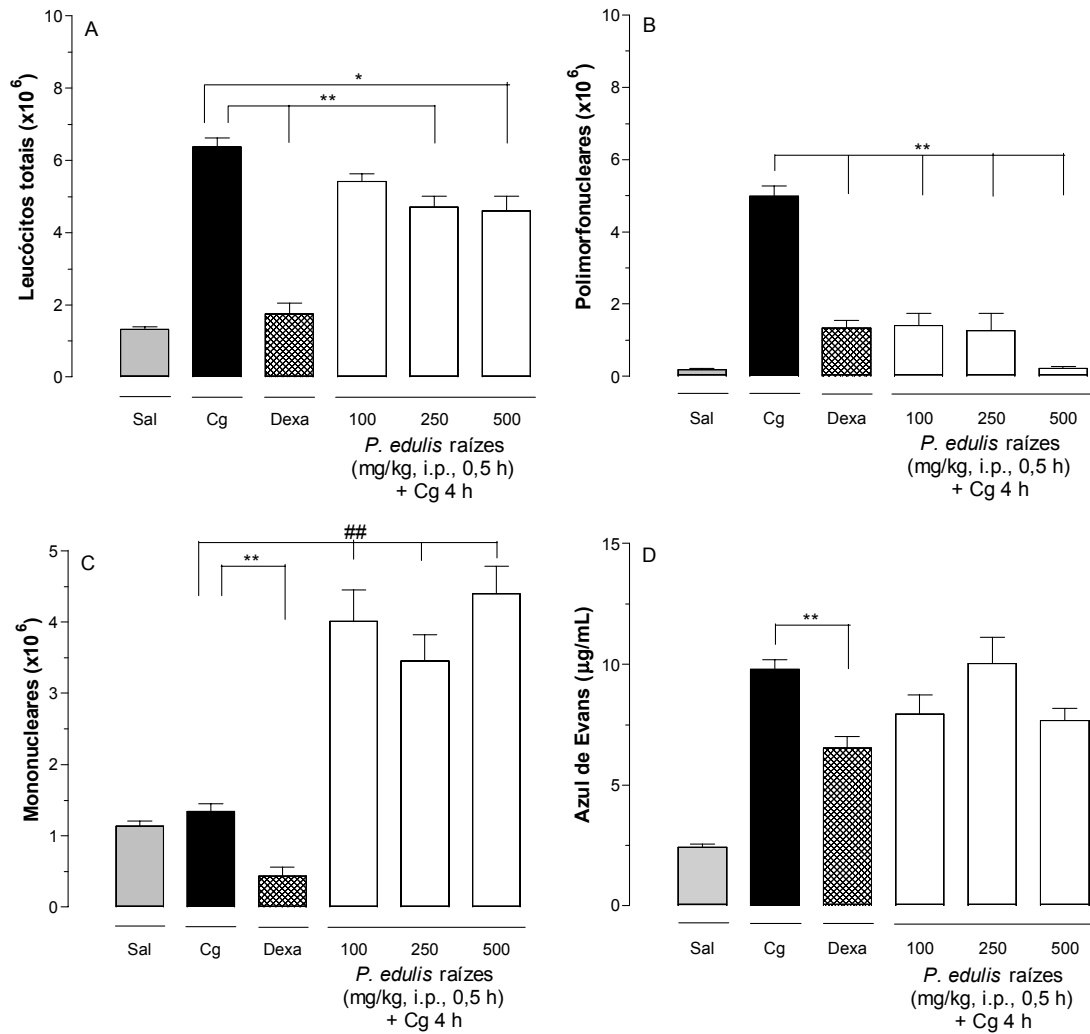
**Tabela 2:** Valores percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com *P. edulis* pericarpo (100-500 mg/kg, i.p., 0,5 h) ou *P. edulis* raízes (100-500 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia, em camundongos

Extrato e dose (mg/kg, i.p., 0,5 h)	Leucócitos totais (% de inibição)	PMN (% de inibição)	MONO (% de inibição ou aumento)	Exsudação (% de inibição)
<i>P. edulis</i> pericarpo 100	-	-	-	-
<i>P. edulis</i> pericarpo 250	-	-	76±31##	-
<i>P. edulis</i> pericarpo 500	-	-	58±21##	-
<i>P. edulis</i> raízes 100	-	60±16**	199±33##	-
<i>P. edulis</i> raízes 250	26±5**	75±10**	155±27##	-
<i>P. edulis</i> raízes 500	28±6*	96±1**	228±29##	-
Dexa 0,5	72±5**	73±4**	67±9**	33±5**

Cada grupo representa a média das percentagens ± e.p.m. de 4 a 6 animais. \* P < 0,05 e \*\* ou ## P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e ## o aumento. Dexa = dexametasona; MONO = mononucleares; PMN = polimorfonucleares.



**Figura 4:** Efeito das diferentes doses do extrato *P. edulis* pericarp (100-500 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, i.pl.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* e ## P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \*\* representa a inibição e ## o aumento.



**Figura 5:** Efeito das diferentes doses do extrato *P. edulis* raízes (100-500 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, i.pl.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 e \*\* ou ## P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e ## o aumento.

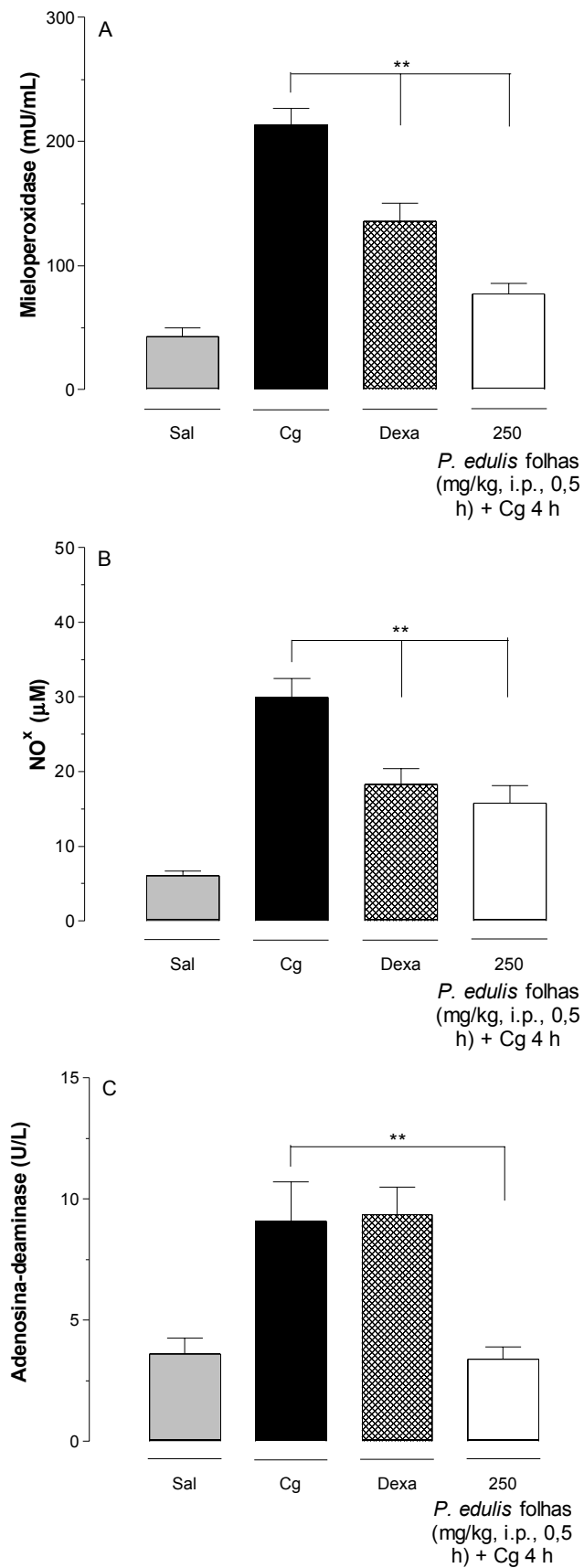
### 5.1.2. Efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre a atividade da mieloperoxidase, níveis de nitrato/nitrito e atividade da adenosina-deaminase, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia

O extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da Cg inibiu de forma significativa a atividade da MPO (mU/mL) (Sal: 42,50±7,28; Cg: 213,20±13,34; 250 mg/kg: 77,20±8,41) ( $P < 0,01$ ) (Figura 6A), os níveis de NO<sup>x</sup> (μM) (Sal: 6,04±0,59; Cg: 29,90±2,59; 250 mg/kg: 15,74±2,40) ( $P < 0,01$ ) (Figura 6B) e a atividade de ADA (U/L) (Sal: 3,60±0,66; Cg: 9,09±1,61; 250 mg/kg: 3,40±0,49) ( $P < 0,01$ ) (Figura 6C) na pleurisia induzida pela Cg. A dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) também inibiu de forma significativa a atividade da MPO (mU/mL) (Sal: 42,50±7,28; Cg: 213,20±13,34; Dexa 0,5 mg/kg: 135,80±14,64) ( $P < 0,01$ ) (Figura 6A) e os níveis de NO<sup>x</sup> (μM) (Sal: 6,04±0,59; Cg: 29,90±2,59; Dexa 0,5 mg/kg: 18,24±2,16) ( $P < 0,01$ ) (Figura 6B), porém não foi eficaz em inibir a ADA ( $P > 0,05$ ) (Figura 6C). Os percentuais de inibição dos parâmetros inflamatórios: MPO, NO<sup>x</sup> e ADA estão listados na tabela 3.

**Tabela 3:** Valores percentuais de inibição da atividade da mieloperoxidase, níveis de óxido nítrico e atividade da adenosina-deaminase em animais tratados com *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia, em camundongos

Extrato e dose (mg/kg, i.p., 0,5 h)	Mieloperoxidase (% de inibição)	Óxido nítrico (% de inibição)	Adenosina-deaminase (% de inibição)
<i>P. edulis</i> folhas 250	64±4**	47±8**	62±5**
Dexa 0,5	36±7**	39±7**	-

Cada grupo representa a média das percentagens ± e.p.m. de 4 a 6 animais. \*\*  $P < 0,01$  representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. Dexa = dexametasona.



**Figura 6:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre a atividade da mieloperoxidase (A), níveis de nitrato/nitrito (NO<sup>x</sup>) (B) e atividade da adenosina-deaminase (C). Sal = Animais somente tratados com salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\* P < 0,01 representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

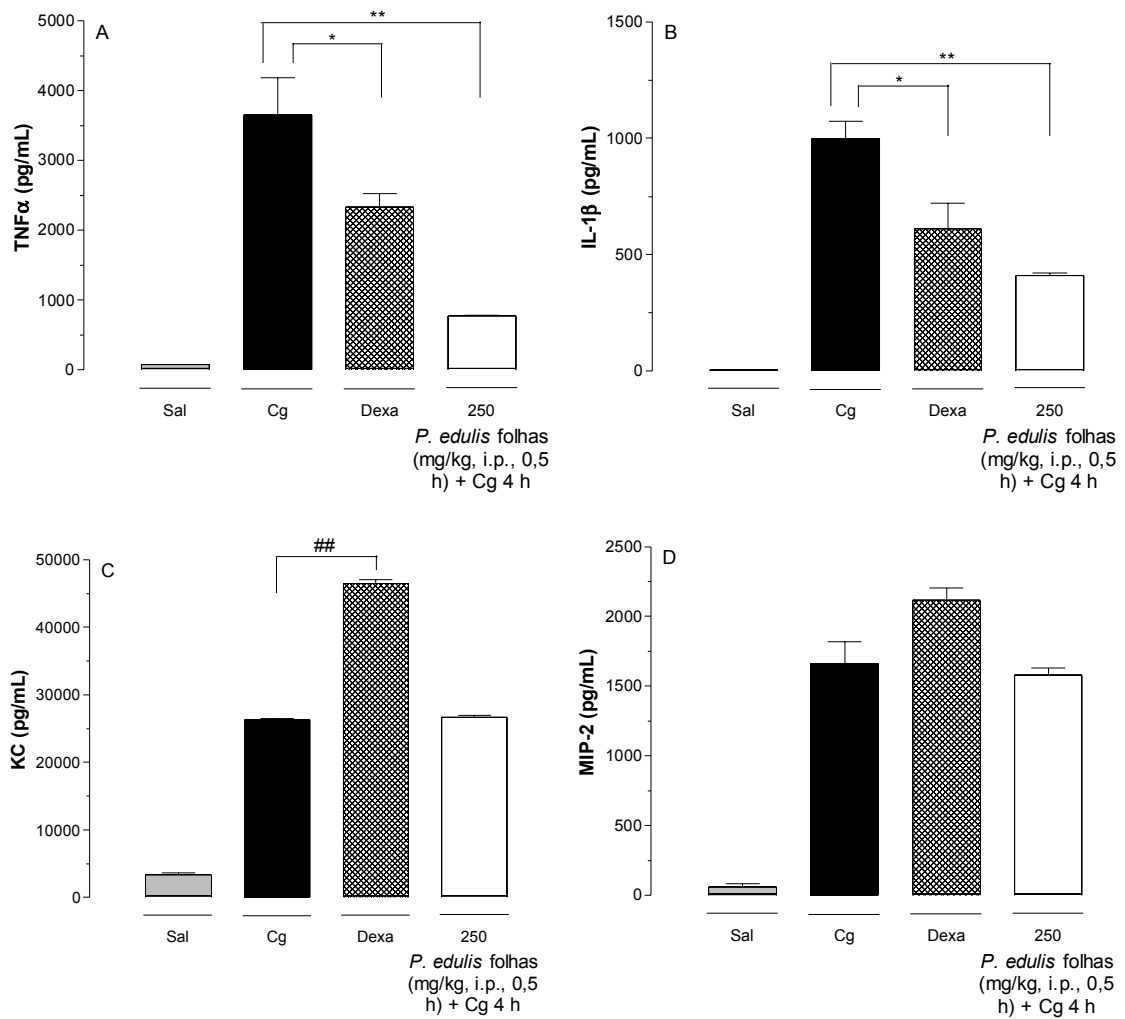
### 5.1.3. Efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia

O extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h) foi efetivo em diminuir significativamente os níveis de TNF $\alpha$  (pg/mL) (Sal: 73,67 $\pm$ 0,01; Cg: 3653,00 $\pm$ 525,20; 250 mg/kg: 773,20 $\pm$ 9,81) ( $P < 0,01$ ) (Figura 7A) e IL-1 $\beta$  (pg/mL) (Sal: 3,38 $\pm$ 3,38; Cg: 998,10 $\pm$ 75,75; 250 mg/kg: 409,30 $\pm$ 12,28) ( $P < 0,01$ ) (Figura 7B) no lavado da cavidade pleural dos animais tratados com extrato, quando comparados com animais inflamados. No entanto, o extrato não foi capaz de diminuir os níveis de KC e MIP-2 ( $P > 0,05$ ) (Figuras 7C e D). Nas mesmas condições experimentais, a dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) inibiu de forma significativa os níveis de TNF $\alpha$  (pg/mL) (Sal: 73,67 $\pm$ 0,01; Cg: 3653,00 $\pm$ 525,20; Dexa 0,5 mg/kg: 2331,00 $\pm$ 189,80) ( $P < 0,05$ ) (Figura 7A) e IL-1 $\beta$  (pg/mL) (Sal: 3,38 $\pm$ 3,38; Cg: 998,10 $\pm$ 75,75; Dexa 0,5 mg/kg: 612,70 $\pm$ 107,90) ( $P < 0,05$ ) (Figura 7B). Além disso, a dexametasona aumentou os níveis de KC (pg/mL) (Sal: 3350,00 $\pm$ 246,30; Cg: 26266,00 $\pm$ 210,70; Dexa 0,5 mg/kg: 46465,00 $\pm$ 575,00) ( $P < 0,01$ ) (Figura 7C) e não modificou os níveis de MIP-2 ( $P > 0,05$ ) (Figura 7D) no exsudato pleural dos animais inflamados. As percentagens de inibição ou aumento das citocinas estudadas: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e MIP-2 estão listados na tabela 4.

**Tabela 4:** Valores percentuais de inibição ou aumento dos níveis de citocinas: fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1 beta, quemocina de neutrófilo e proteína inflamatória de macrófago 2 em animais tratados com *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da pleurisia, em camundongos

Extrato e dose (mg/kg, i.p., 0,5 h)	TNF $\alpha$ (% de inibição)	IL-1 $\beta$ (% de inibição)	KC (% de aumento)	MIP-2 (% de inibição ou aumento)
<i>P. edulis</i> folhas 250	79 $\pm$ 1**	59 $\pm$ 1**	-	-
Dexa 0,5	36 $\pm$ 5*	39 $\pm$ 11*	77 $\pm$ 1##	-

Cada grupo representa a média das percentagens  $\pm$  e.p.m. de 2 a 3 animais. \*  $P < 0,05$  e \*\* ou ##  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e ## o aumento. Dexa = dexametasona; IL-1 $\beta$  = interleucina 1 beta; KC = quemocina de neutrófilo; MIP-2 = proteína inflamatória de macrófago 2; TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa.



**Figura 7:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de citocinas TNF $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), KC (C) e MIP-2 (D). Sal = Animais somente tratados com salina estéril (NaCl 0,9%, i.pl.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 2 a 3 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 e \*\* ou ## P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e ## o aumento.



#### 5.1.4. Efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre a migração de leucócitos e exsudação, na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da pleurisia

Na pleurisia induzida pela BK, a administração do extrato *P. edulis* folhas inibiu de forma significativa os leucócitos na dose de 500 mg/kg (i.p.) ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,32 \pm 0,08$ ; BK:  $1,79 \pm 0,13$ ; 500 mg/kg:  $1,22 \pm 0,08$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 8A). Além disso, este extrato inibiu os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,18 \pm 0,03$ ; BK:  $0,22 \pm 0,03$ ; 250 mg/kg:  $0,05 \pm 0,01$ ; 500 mg/kg:  $0,13 \pm 0,03$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 8B) e os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,14 \pm 0,07$ ; BK:  $1,57 \pm 0,13$ ; 500 mg/kg:  $1,09 \pm 0,10$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 8C). *P. edulis* folhas em nenhuma dose testada foi efetiva em inibir a exsudação ( $P > 0,05$ ) (Figura 8D). É importante ressaltar que na dose de 250 mg/kg (i.p.) não se observou inibição os leucócitos ( $P > 0,05$ ) (Figura 8A).

A administração de dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) foi efetiva em diminuir significativamente a migração leucocitária ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,32 \pm 0,08$ ; BK:  $1,79 \pm 0,13$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $1,00 \pm 0,04$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 8A), os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,18 \pm 0,03$ ; BK:  $0,22 \pm 0,03$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,05 \pm 0,08$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 8B), os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,14 \pm 0,07$ ; BK:  $1,57 \pm 0,13$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,95 \pm 0,07$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 8C) e a exsudação (Sal:  $2,42 \pm 0,14$ ; BK:  $2,74 \pm 0,18$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,36 \pm 0,04$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 8D).

Na pleurisia induzida pela HIST, o extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da HIST, inibiu significativamente a migração leucocitária ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,32 \pm 0,08$ ; HIST:  $2,27 \pm 0,26$ ; 250 mg/kg:  $1,38 \pm 0,14$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 9A). Esta inibição ocorreu às custas de PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,18 \pm 0,03$ ; HIST:  $0,43 \pm 0,14$ ; 250 mg/kg:  $0,03 \pm 0,01$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 9B). Nestas mesmas condições experimentais, o extrato não inibiu os MONO ou a exsudação ( $P > 0,05$ ) (Figuras 9C e D).

Neste protocolo experimental, o fármaco dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) diminuiu de forma significativa a migração de leucócitos ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,32 \pm 0,08$ ; HIST:  $1,79 \pm 0,13$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $1,00 \pm 0,04$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 9A), os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,18 \pm 0,03$ ; HIST:  $0,22 \pm 0,03$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,05 \pm 0,08$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 9B) e os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,14 \pm 0,07$ ; HIST:  $1,57 \pm 0,13$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,95 \pm 0,07$ ) ( $P$

< 0,05) (Figura 9C). Nem o extrato de *P. edulis* folhas nem a dexametasona foram capazes de inibir a exsudação induzida pela HIST ( $P > 0,05$ ) (Figura 9D).

Já na pleurisia induzida pela SP, o extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h) inibiu significativamente os leucócitos ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,32 \pm 0,08$ ; SP:  $3,03 \pm 0,18$ ; 250 mg/kg:  $1,67 \pm 0,26$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 10A) e os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,18 \pm 0,03$ ; SP:  $2,05 \pm 0,18$ ; 250 mg/kg:  $0,39 \pm 0,22$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 10B). Por outro lado, este extrato aumentou os níveis de MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,14 \pm 0,07$ ; SP:  $0,98 \pm 0,09$ ; 250 mg/kg:  $1,28 \pm 0,09$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 10C). Ainda nestas mesmas condições, o extrato diminuiu a exsudação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sal:  $2,42 \pm 0,14$ ; SP:  $4,04 \pm 0,31$ ; 250 mg/kg:  $2,65 \pm 0,27$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 10D).

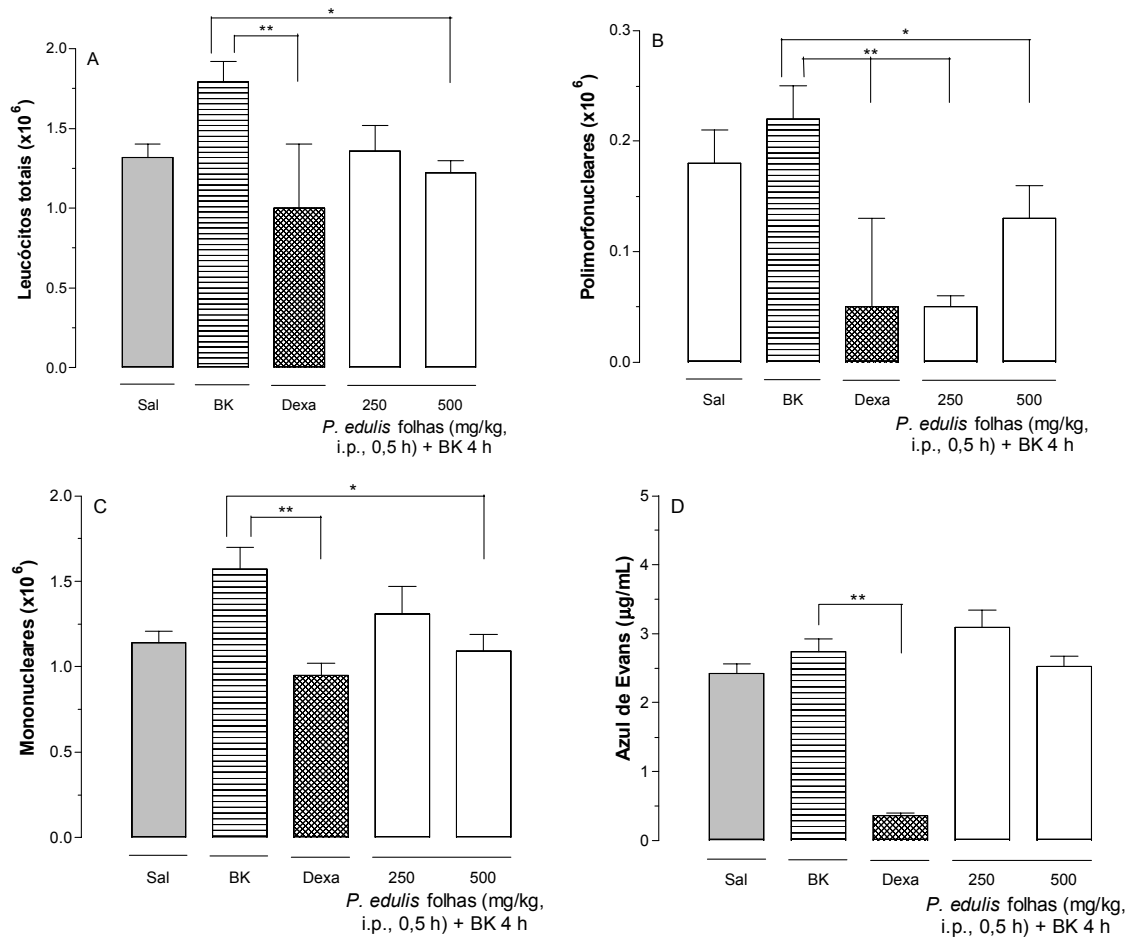
A dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) inibiu significativamente os leucócitos ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $1,32 \pm 0,08$ ; SP:  $3,03 \pm 0,18$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $2,00 \pm 0,17$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 10A), os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,18 \pm 0,03$ ; SP:  $2,05 \pm 0,18$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,80 \pm 0,40$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 10B) e a exsudação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sal:  $2,42 \pm 0,14$ ; SP:  $4,04 \pm 0,31$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,50 \pm 0,10$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 10D).

Os percentuais de inibição ou aumento do extrato e da dexametasona na pleurisia induzida pela BK, HIST ou SP encontram-se listados na tabela 5.

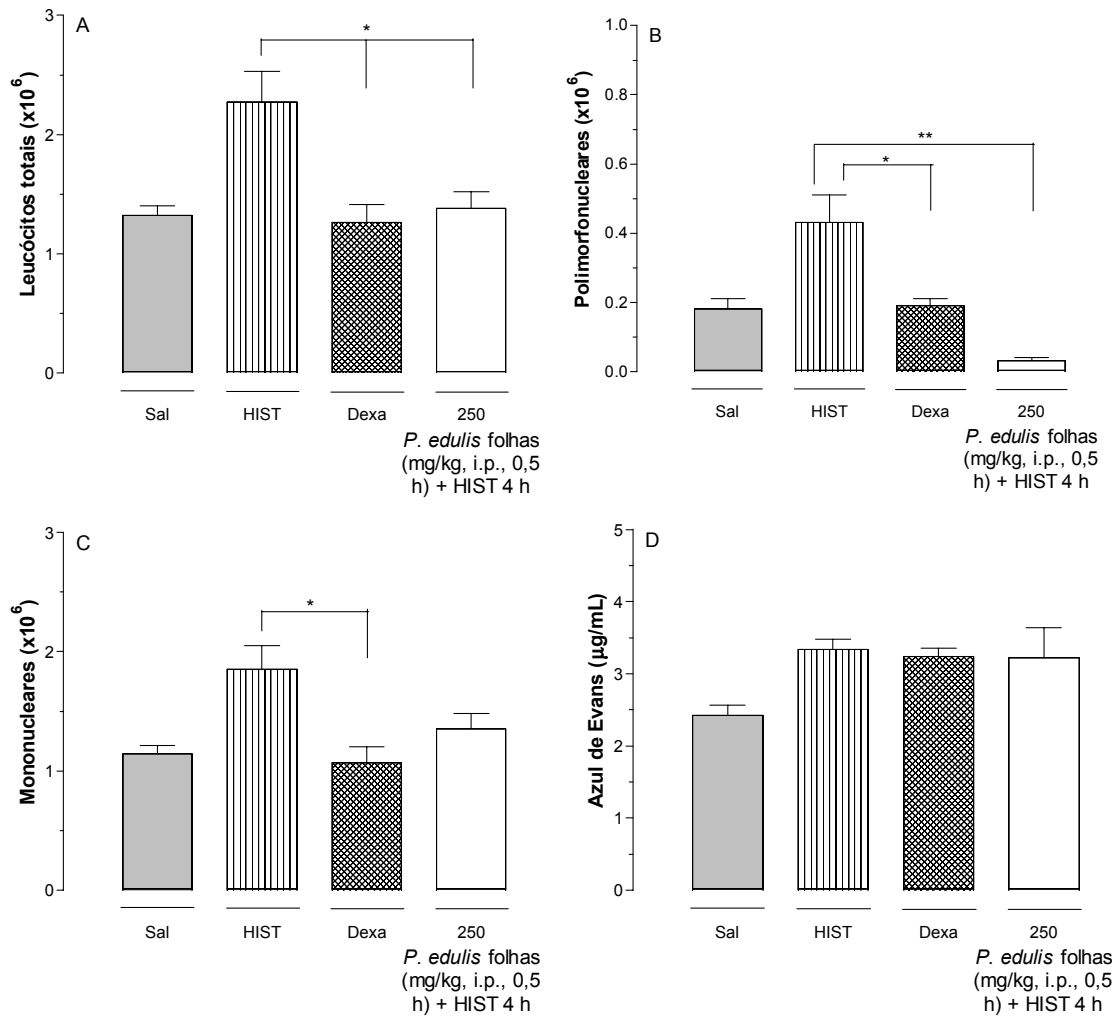
**Tabela 5:** Valores percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da pleurisia, em camundongos

Extrato e dose (mg/kg, i.p., 0,5 h)	Bradicinina (% de inibição)	Histamina (% de inibição)	Substância P (% de inibição ou aumento)
<b>Leucócitos totais</b>			
<i>P. edulis</i> folhas 250	-	39±6*	36±12**
<i>P. edulis</i> folhas 500	26±5*	-	-
Dexa 0,5	39±2**	45±7*	34±6**
<b>Polimorfonucleares</b>			
<i>P. edulis</i> folhas 250	80±5**	93±2**	81±11**
<i>P. edulis</i> folhas 500	45±14*	-	-
Dexa 0,5	78±3**	56±6*	60±20*
<b>Mononucleares</b>			
<i>P. edulis</i> folhas 250	-	-	30±10#
<i>P. edulis</i> folhas 500	23±7*	-	-
Dexa 0,5	33±5**	42±7*	-
<b>Exsudação</b>			
<i>P. edulis</i> folhas 250	-	-	34±7**
<i>P. edulis</i> folhas 500	-	-	-
Dexa 0,5	86±2**	-	88±2**

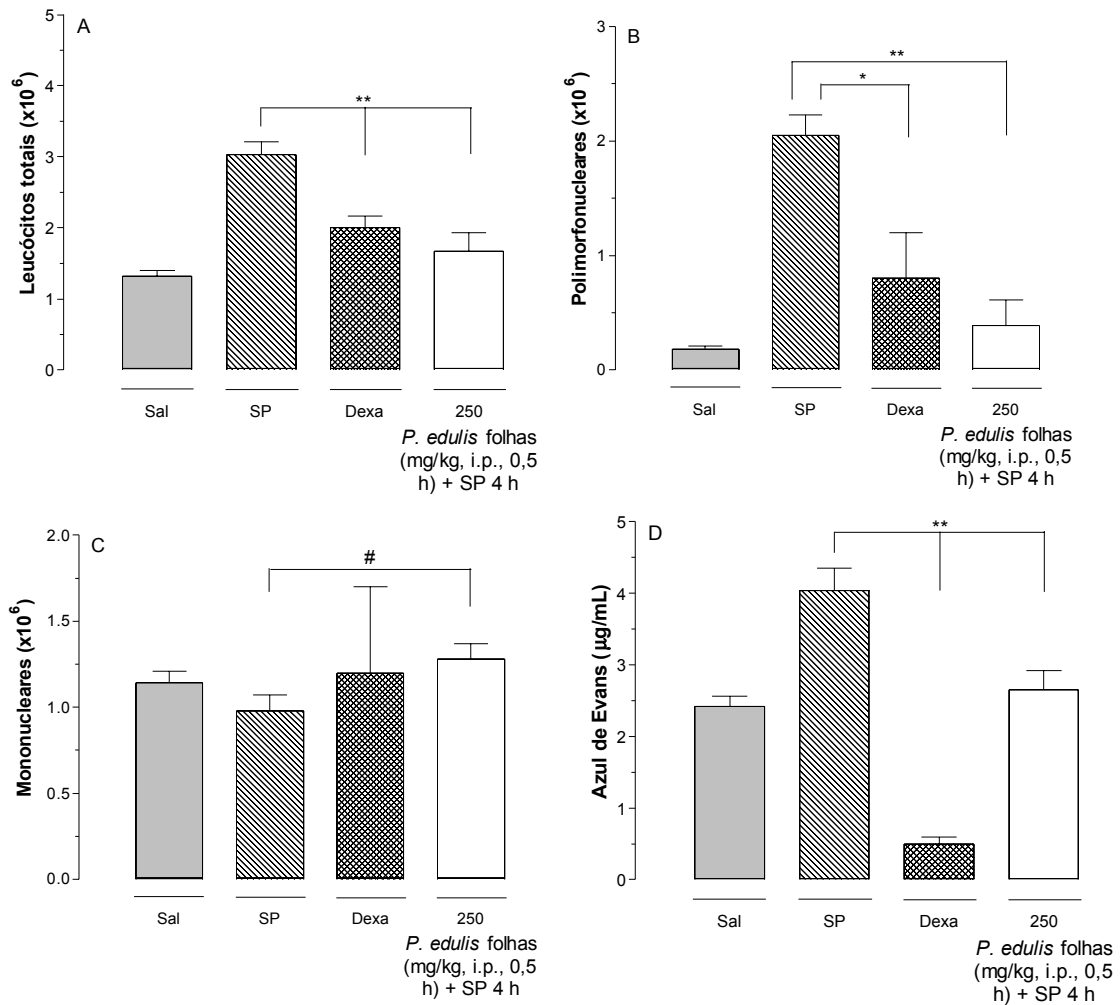
Cada grupo representa a média das percentagens ± e.p.m. de 4 a 6 animais. \* e # P < 0,05 e \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com um dos agentes flogísticos e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e # o aumento. Dexa = dexametasona.



**Figura 8:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250-500 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da bradicinina (BK 10 nmol/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, i.pl.). BK = Animais tratados apenas com bradicinina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e bradicinina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a bradicinina e os demais grupos.



**Figura 9:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da histamina (HIST 100  $\mu\text{g/cav.}$ ) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, i.pl.). HIST = Animais tratados apenas com histamina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e histamina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a histamina e os demais grupos.



**Figura 10:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da substância P (SP 20 nmol/cav.) no modelo da pleurisia em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, i.pl.). SP = Animais tratados apenas com substância P. Dexa = Animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p., 0,5 h) e substância P. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \* ou #  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a substância P e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e # o aumento.

## 5.2. RESULTADOS OBTIDOS NO MODELO DA BOLSA DE AR

### 5.2.1. Efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre a migração de leucócitos e exsudação, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar

O extrato *P. edulis* folhas nas doses de 100-500 mg/kg (i.p.) 0,5 h antes da Cg foi efetivo em inibir significativamente a migração de leucócitos no lavado da bolsa de ar dos animais tratados com extrato quando comparados com grupo-controle: Cg ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; Cg:  $8,25 \pm 0,53$ ; 100 mg/kg:  $5,59 \pm 0,47$ ; 250 mg/kg:  $5,78 \pm 0,59$ ; 500 mg/kg:  $5,54 \pm 0,98$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 11A). Esta inibição ocorreu devido a uma inibição na migração de PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,06$ ; Cg:  $7,08 \pm 0,53$ ; 100 mg/kg:  $3,69 \pm 0,42$ ; 250 mg/kg:  $4,59 \pm 0,77$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 11B). Na dose de 500 mg/kg (i.p.) este extrato não alterou os níveis de PMN ( $P > 0,05$ ) (Figura 11B). *P. edulis* folhas nas doses de 50 e 100 mg/kg (i.p., 0,5 h) aumentou os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,45 \pm 0,17$ ; Cg:  $1,17 \pm 0,34$ ; 50 mg/kg:  $1,84 \pm 0,30$ ; 100 mg/kg:  $1,90 \pm 0,34$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 11C). Além disso, o extrato nas doses de 50 e 500 mg/kg (i.p.) também aumentou os níveis de azul de Evans ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sal:  $1,69 \pm 0,22$ ; Cg:  $10,69 \pm 0,50$ ; 50 mg/kg:  $14,30 \pm 1,52$ ; 500 mg/kg:  $13,09 \pm 0,35$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 9D).

A dexametasona inibiu os leucócitos ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; Cg:  $8,25 \pm 0,53$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $2,65 \pm 0,20$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 11A), os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,06$ ; Cg:  $7,08 \pm 0,53$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $2,25 \pm 0,17$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 11B) e os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,45 \pm 0,17$ ; Cg:  $1,17 \pm 0,34$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,40 \pm 0,04$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 11C). O fármaco não foi efetivo em inibir a exsudação ( $P > 0,05$ ) (Figura 11D).

As percentagens de inibição ou aumento do extrato *P. edulis* folhas e da dexametasona sobre os parâmetros inflamatórios: leucócitos, PMN, MONO e exsudação estão listados na tabela 6.

Na análise do perfil temporal, o extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) foi efetivo em inibir a migração de leucócitos somente quando administrado 0,5 h antes da Cg ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; Cg:  $8,25 \pm 0,53$ ; 0,5 h:  $5,59 \pm 0,47$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 12A). Esse efeito inibitório sobre a migração celular ocorreu às custas de PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,06$ ; Cg:  $7,08 \pm 0,53$ ; 0,5 h:  $3,68 \pm 0,42$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 12B). Nestas mesmas condições experimentais, o extrato foi efetivo em aumentar os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,45 \pm 0,06$ ; Cg:  $1,17 \pm 0,17$ ; 0,5 h:  $1,90 \pm 0,30$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 12C). O extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) quando administrado 2 e 4 h antes

da indução da inflamação pela Cg, aumentou de forma significativa à migração de leucócitos para a bolsa de ar ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; Cg:  $8,25 \pm 0,53$ ; 2 h:  $11,98 \pm 0,85$ ; 4 h:  $16,47 \pm 1,20$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 12A), os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,06$ ; Cg:  $7,08 \pm 0,53$ ; 2 h:  $10,55 \pm 0,79$ ; 4 h:  $14,78 \pm 1,10$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 12B) e os níveis de azul de Evans ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sal:  $1,69 \pm 0,22$ ; Cg:  $10,69 \pm 0,50$ ; 2 h:  $13,74 \pm 0,94$ ; 4 h:  $17,94 \pm 0,60$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 12D).

Os percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros estudados: leucócitos totais, PMN, MONO e exsudação em diferentes tempos de pré-tratamento estão listados na tabela 7.

**Tabela 6:** Valores percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com *P. edulis* folhas (50-500 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos

<i>Extrato e dose</i> (mg/kg, i.p., 0,5 h)	<b>Leucócitos totais</b> (% de inibição ou aumento)	<b>PMN</b> (% de inibição ou aumento)	<b>MONO</b> (% de inibição ou aumento)	<b>Exsudação</b> (% de aumento)
<i>P. edulis</i> folhas 50	48±16###	47±16#	59±27#	35±13#
<i>P. edulis</i> folhas 100	32±6*	48±6**	66±24#	-
<i>P. edulis</i> folhas 250	30±7*	35±11*	-	-
<i>P. edulis</i> folhas 500	34±11*	-	-	22±3#
Dexa 0,5	68±2**	68±2**	66±4**	-

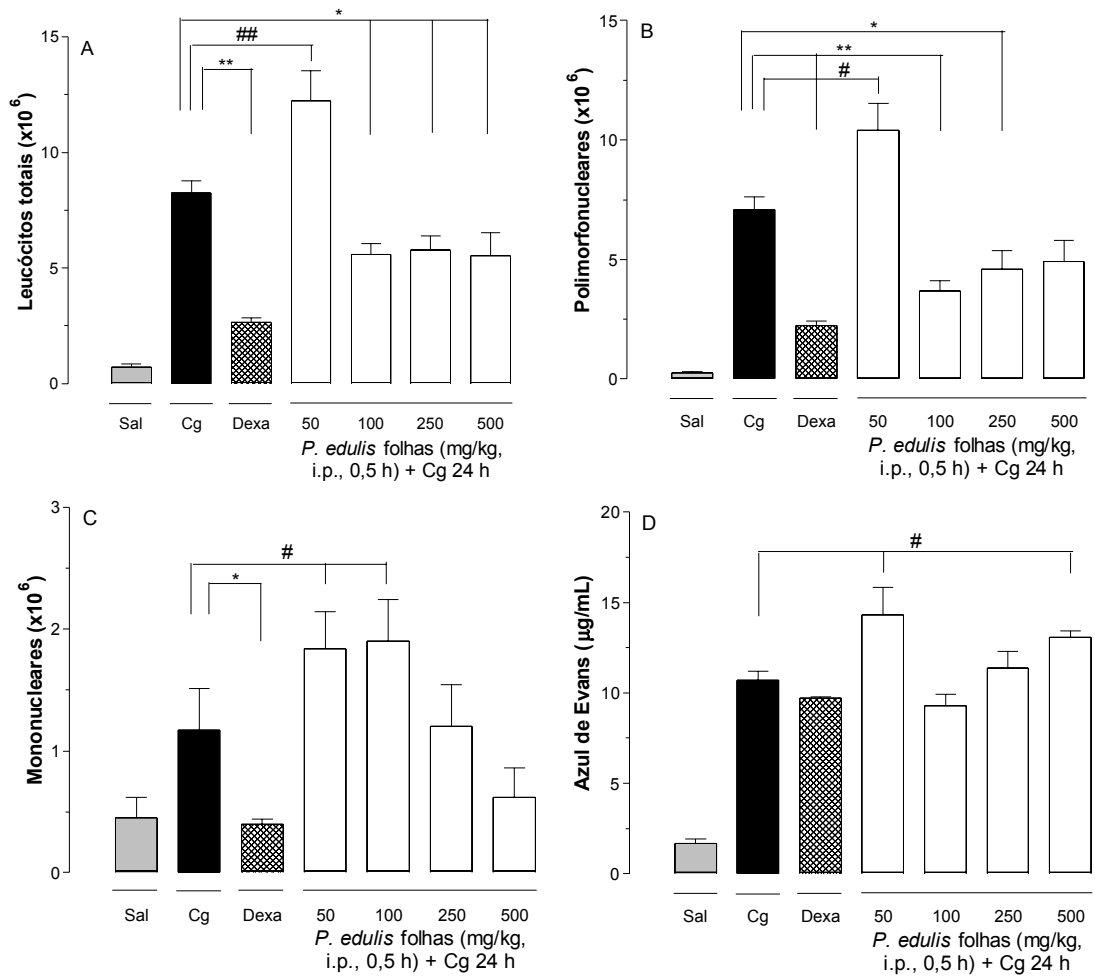
Cada grupo representa a média das percentagens  $\pm$  e.p.m. de 4 a 6 animais. \* ou #  $P < 0,05$  e \*\* ou ###  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e # e ## o aumento. Dexa = dexametasona; MONO = mononucleares; PMN = polimorfonucleares.

**Tabela 7:** Valores percentuais de inibição ou aumento dos parâmetros inflamatório: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrada de 0,5 a 4 h antes da indução da inflamação pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos

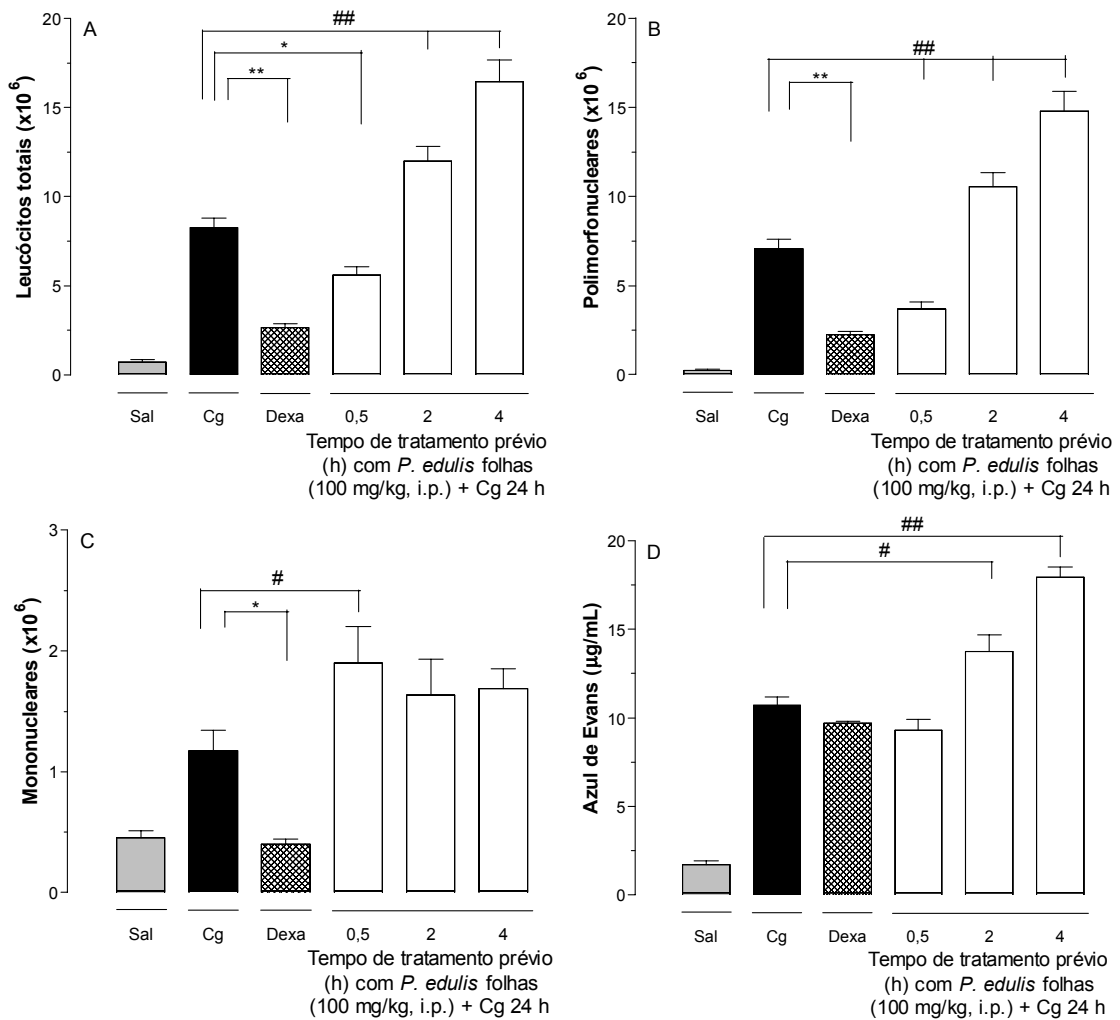
<b>Tempo de tratamento prévio (h)</b>	<b>Leucócitos totais</b> (% de inibição ou aumento)	<b>PMN</b> (% de inibição ou aumento)	<b>MONO</b> (% de aumento)	<b>Exsudação</b> (% de aumento)
0,5	32±6*	48±6**	66±34#	-
2	45±10##	49±11##	-	29±8#
4	100±14##	109±16##	-	68±6##

Cada grupo representa a média das percentagens  $\pm$  e.p.m. de 4 a 6 animais. \* ou #  $P < 0,05$  e \*\* ou ##  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e # e ## o aumento. MONO = mononucleares; PMN = polimorfonucleares.





**Figura 11:** Efeito das diferentes doses do extrato *P. edulis* folhas (50-500 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, s.c.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (duas doses de 0,5 mg/kg, i.p.) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \* ou #  $P < 0,05$  e \*\* ou ##  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e # e ## o aumento.



**Figura 12:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5-4 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais somente tratados com salina estéril (NaCl 0,9%, s.c.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (duas doses de 0,5 mg/kg, i.p.) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \* ou # P < 0,05 e \*\* ou ## P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. \* e \*\* representam a inibição e # e ## o aumento.

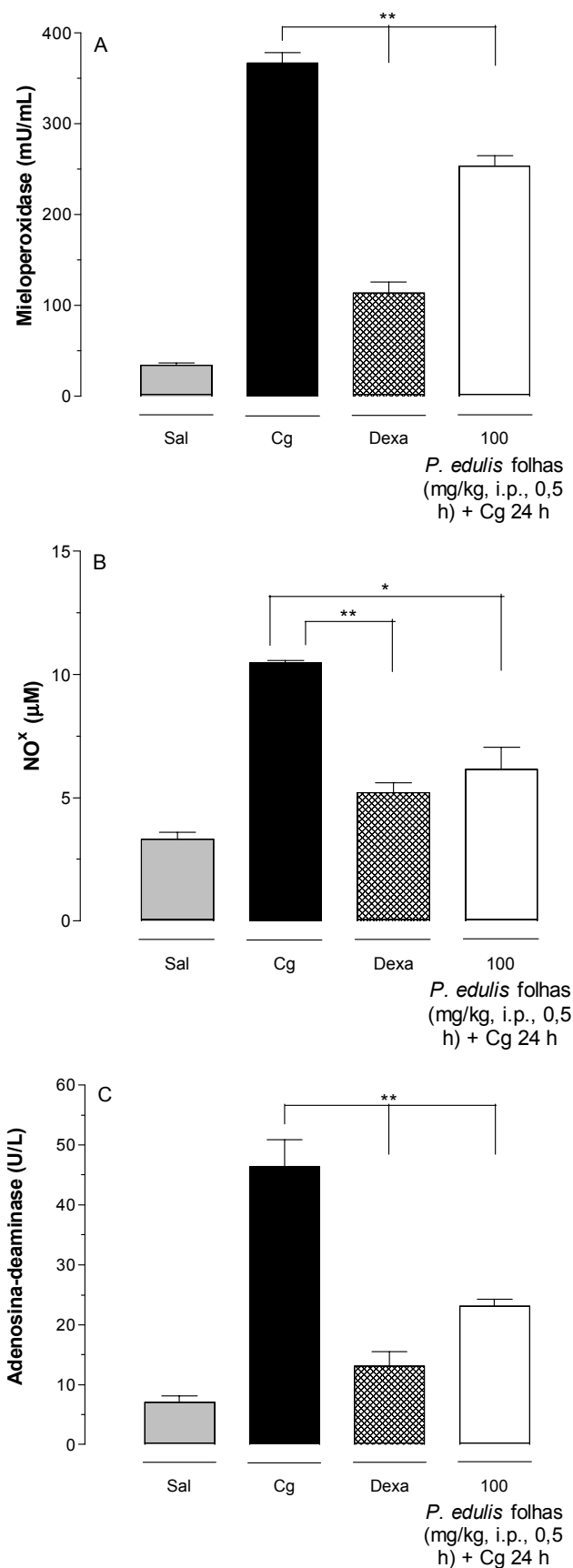
### 5.2.2. Efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre a atividade da mieloperoxidase, adenosina-deaminase e níveis de nitrato/nitrito, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar

O extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da Cg, inibiu de forma significativa a atividade da MPO (mU/mL) (Sal: 33,76±2,48; Cg: 366,40±11,76; 100 mg/kg: 253,10±11,61) ( $P < 0,01$ ) (Figura 13A), os níveis de NO<sup>x</sup> (μM) (Sal: 3,32±0,28; Cg: 10,46±0,96; 100 mg/kg: 6,15±0,88) ( $P < 0,05$ ) (Figura 13B) e a atividade da ADA (U/L) (Sal: 7,07±1,10; Cg: 46,43±4,46; 100 mg/kg: 23,09±1,17) ( $P < 0,01$ ) (Figura 13C) na inflamação induzida pela Cg. Nas mesmas condições experimentais a dexametasona também inibiu a atividade da MPO (mU/mL) (Sal: 33,76±2,48; Cg: 366,40±11,76; Dexa 0,5 mg/kg: 113,90±11,71) ( $P < 0,01$ ) (Figura 13A), os níveis de NO<sup>x</sup> (μM) (Sal: 3,32±0,28; Cg: 10,46±0,96; Dexa 0,5 mg/kg: 5,21±0,38) ( $P < 0,01$ ) (Figura 13B) e a atividade da ADA (U/L) (Sal: 7,07±1,10; Cg: 46,43±4,46; Dexa 0,5 mg/kg: 13,06±2,45) ( $P < 0,01$ ) (Figura 13C). Os percentuais de inibição dos parâmetros estudados: MPO, NO<sup>x</sup> e ADA estão listados na tabela 8.

**Tabela 8:** Valores percentuais de inibição da atividade da mieloperoxidase, níveis de óxido nítrico e atividade da adenosina-deaminase em animais tratados com *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos

Extrato e dose (mg/kg, i.p., 0,5 h)	Mieloperoxidase (% de inibição)	Óxido nítrico (% de inibição)	Adenosina-deaminase (% de inibição)
<i>P. edulis</i> folhas 100	31±3**	41±8*	50±3**
Dexa 0,5	69±3**	50±4**	72±5**

Cada grupo representa a média das percentagens ± e.p.m. de 4 a 6 animais. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. Dexa = dexametasona.



**Figura 13:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da bolsa de ar de camundongos, sobre a atividade da mieloperoxidase (A), níveis de nitrato/nitrito (NO<sup>x</sup>) (B) e atividade da adenosina-deaminase (C). Sal = Animais somente tratados com salina estéril (NaCl 0,9%, s.c.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (duas doses de 0,5 mg/kg, i.p.) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

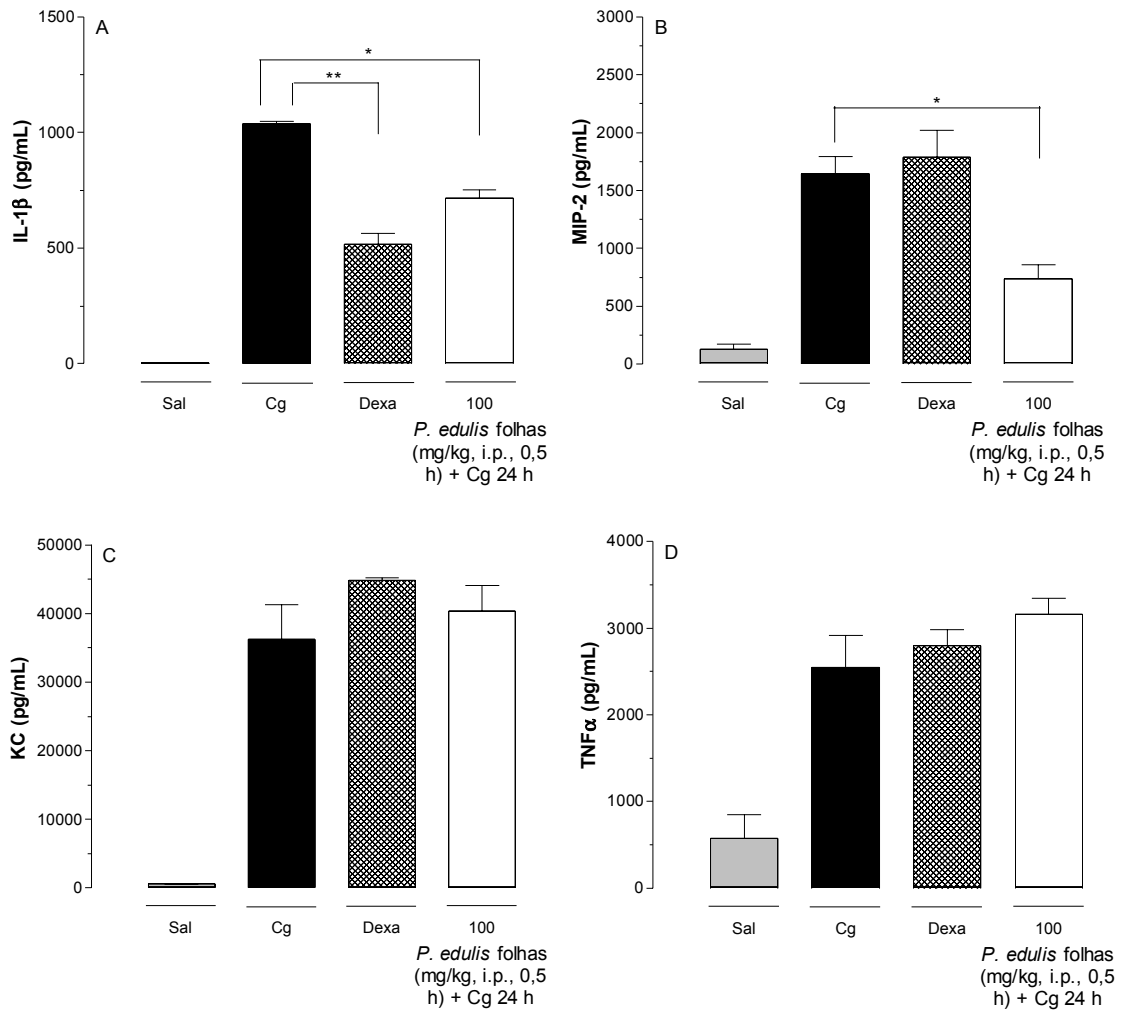
### 5.2.3. Efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa, Interleucina 1 beta, Quemocina de Neutrófilo e Proteína Inflamatória de Macrófago 2, na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar

O extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p., 0,5 h) foi efetivo em diminuir significativamente os níveis de IL-1 $\beta$  (pg/mL) (Sal: 0,0 $\pm$ 0,0; Cg: 1037,00 $\pm$ 11,25; 100 mg/kg: 714,80 $\pm$ 36,25) ( $P < 0,05$ ) (Figura 14A) e MIP-2 (pg/mL) (Sal: 126,00 $\pm$ 48,50; Cg: 1642,00 $\pm$ 147,80; 100 mg/kg: 734,90 $\pm$ 120,40) ( $P < 0,05$ ) (Figura 14B) no lavado da bolsa de ar dos animais tratados com *P. edulis* folhas. No entanto, o extrato não foi capaz de inibir as citocinas KC e TNF $\alpha$  ( $P > 0,05$ ) (Figuras 14C e D). A dexametasona diminuiu apenas os níveis de IL-1 $\beta$  (pg/mL) (Sal: 0,0 $\pm$ 0,0; Cg: 1037,00 $\pm$ 11,25; Dexa 0,5 mg/kg: 516,00 $\pm$ 47,26) ( $P < 0,01$ ) (Figura 14A) e não alterou os níveis de MIP-2, KC e TNF $\alpha$  ( $P > 0,05$ ) (Figura 14B, C e D). As percentagens de inibição das citocinas estudadas: IL-1 $\beta$ , MIP-2, KC e TNF $\alpha$  estão listados na tabela 9.

**Tabela 9:** Valores percentuais de inibição dos níveis de citocinas: interleucina 1 beta, proteína inflamatória de macrófago 2, quemocina de neutrófilo e fator de necrose tumoral alfa em animais tratados com *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela carragenina no modelo da bolsa de ar, em camundongos

Extrato e dose (mg/kg, i.p., 0,5 h)	IL-1 $\beta$ (% de inibição)	MIP-2 (% de inibição)	KC (% de inibição)	TNF $\alpha$ (% de inibição)
<i>P. edulis</i> folhas 100	31 $\pm$ 3*	48 $\pm$ 7*	-	-
Dexa 0,5	50 $\pm$ 5**	-	-	-

Cada grupo representa a média das percentagens  $\pm$  e.p.m. de 2 a 3 animais. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos. Dexa = dexametasona; IL-1 $\beta$  = interleucina 1 beta; KC = quemocina de neutrófilo; MIP-2 = proteína inflamatória de macrófago 2; TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa.



**Figura 14:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da carragenina (Cg 1%/cav.) no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre os níveis de citocinas IL-1 $\beta$  (A), MIP-2 (B), KC (C) e TNF $\alpha$  (D). Sal = Animais somente tratados com salina estéril (NaCl 0,9%, s.c.). Cg = Animais tratados apenas com carragenina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (duas doses de 0,5 mg/kg, i.p.) e carragenina. Cada grupo representa uma média de 2 a 3 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a carragenina e os demais grupos.

#### 5.2.4. Efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre a migração de leucócitos e exsudação, na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da bolsa de ar

No modelo da bolsa de ar induzida pela BK, o extrato *P. edulis* folhas administrado 0,5 h antes, inibiu de forma significativa os leucócitos na dose de 100 mg/kg (i.p.) ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; BK:  $0,75 \pm 0,05$ ; 100 mg/kg:  $0,40 \pm 0,02$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 15A). Este extrato inibiu os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,06$ ; BK:  $0,53 \pm 0,04$ ; 100 mg/kg:  $0,26 \pm 0,01$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 15B) e os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,45 \pm 0,17$ ; BK:  $0,22 \pm 0,02$ ; 100 mg/kg:  $0,14 \pm 0,01$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 15C). O extrato estudado não inibiu a exsudação ( $P > 0,05$ ) (Figura 15D).

A administração de dexametasona (duas doses de 0,5 mg/kg, i.p.) foi efetiva em inibir significativamente a migração leucocitária ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; BK:  $0,75 \pm 0,05$ ; Dexametasona 0,5 mg/kg:  $0,30 \pm 0,03$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 15A) e os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,06$ ; BK:  $0,53 \pm 0,04$ ; Dexametasona 0,5 mg/kg:  $0,08 \pm 0,02$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 15B). O fármaco não foi efetivo em inibir os MONO, nem a exsudação ( $P > 0,05$ ) (Figuras 15C e D).

Na bolsa de ar induzida pela HIST, o extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p., 0,5 h), inibiu significativamente a migração leucocitária ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; HIST:  $1,25 \pm 0,10$ ; 100 mg/kg:  $0,59 \pm 0,06$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16A). Esta inibição ocorreu às custas de PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,06$ ; HIST:  $0,64 \pm 0,04$ ; 100 mg/kg:  $0,28 \pm 0,03$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16B) e MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,45 \pm 0,17$ ; HIST:  $0,71 \pm 0,05$ ; 100 mg/kg:  $0,31 \pm 0,03$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16C). Nestas mesmas condições experimentais, o extrato ainda inibiu a exsudação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sal:  $1,69 \pm 0,22$ ; HIST:  $1,63 \pm 0,09$ ; 100 mg/kg:  $1,16 \pm 0,08$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16D).

Neste protocolo experimental, a dexametasona diminuiu significativamente a migração de leucócitos ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; HIST:  $1,25 \pm 0,10$ ; Dexametasona 0,5 mg/kg:  $0,16 \pm 0,03$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16A), os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,01$ ; HIST:  $0,64 \pm 0,04$ ; Dexametasona 0,5 mg/kg:  $0,07 \pm 0,01$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16B), os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,45 \pm 0,17$ ; HIST:  $0,71 \pm 0,05$ ; Dexametasona 0,5 mg/kg:  $0,09 \pm 0,02$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16C) e a exsudação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sal:  $1,69 \pm 0,22$ ; HIST:  $1,63 \pm 0,09$ ; Dexametasona 0,5 mg/kg:  $0,93 \pm 0,03$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 16D).

Já na bolsa de ar induzida pela SP, o extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da SP, inibiu de forma significativa os leucócitos ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; SP:  $0,87 \pm 0,04$ ; 100 mg/kg:  $0,35 \pm 0,02$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17A), os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,06$ ; SP:  $0,21 \pm 0,01$ ; 100 mg/kg:  $0,08 \pm 0,01$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17B) e os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,45 \pm 0,17$ ; SP:  $0,64 \pm 0,02$ ; 100 mg/kg:  $0,27 \pm 0,02$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17C). Ainda nestas mesmas condições, o extrato diminuiu a exsudação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sal:  $1,69 \pm 0,22$ ; SP:  $8,93 \pm 1,03$ ; 100 mg/kg:  $4,60 \pm 0,92$ ) ( $P < 0,05$ ) (Figura 17D).

A dexametasona (duas doses de 0,5 mg/kg, i.p.) inibiu significativamente os leucócitos ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,72 \pm 0,14$ ; SP:  $0,87 \pm 0,04$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,08 \pm 0,01$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17A), os PMN ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,26 \pm 0,06$ ; SP:  $0,21 \pm 0,01$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,02 \pm 0,01$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17B), os MONO ( $\times 10^6$ ) (Sal:  $0,45 \pm 0,17$ ; SP:  $0,64 \pm 0,02$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $0,06 \pm 0,01$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17C) e a exsudação ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Sal:  $1,69 \pm 0,22$ ; SP:  $8,93 \pm 1,03$ ; Dexa 0,5 mg/kg:  $2,87 \pm 0,38$ ) ( $P < 0,01$ ) (Figura 17D).

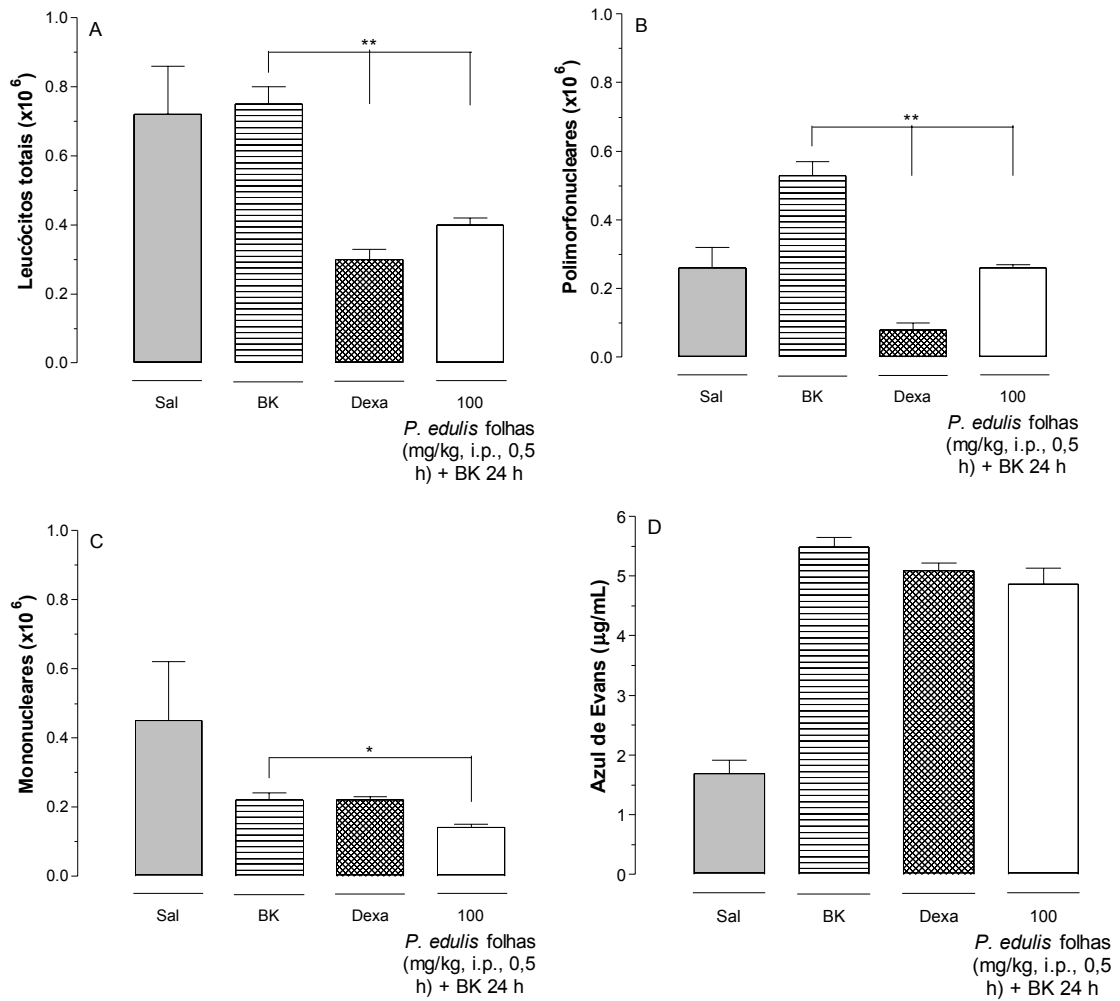
Os percentuais de inibição do extrato e da dexametasona na bolsa de ar induzida pela BK, HIST ou SP encontram-se listados na tabela 10.

**Tabela 10:** Valores percentuais de inibição dos parâmetros inflamatórios: leucócitos, polimorfonucleares, mononucleares e exsudação em animais tratados com *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p., 0,5 h), na inflamação induzida pela bradicinina, histamina ou substância P no modelo da bolsa de ar, em camundongos

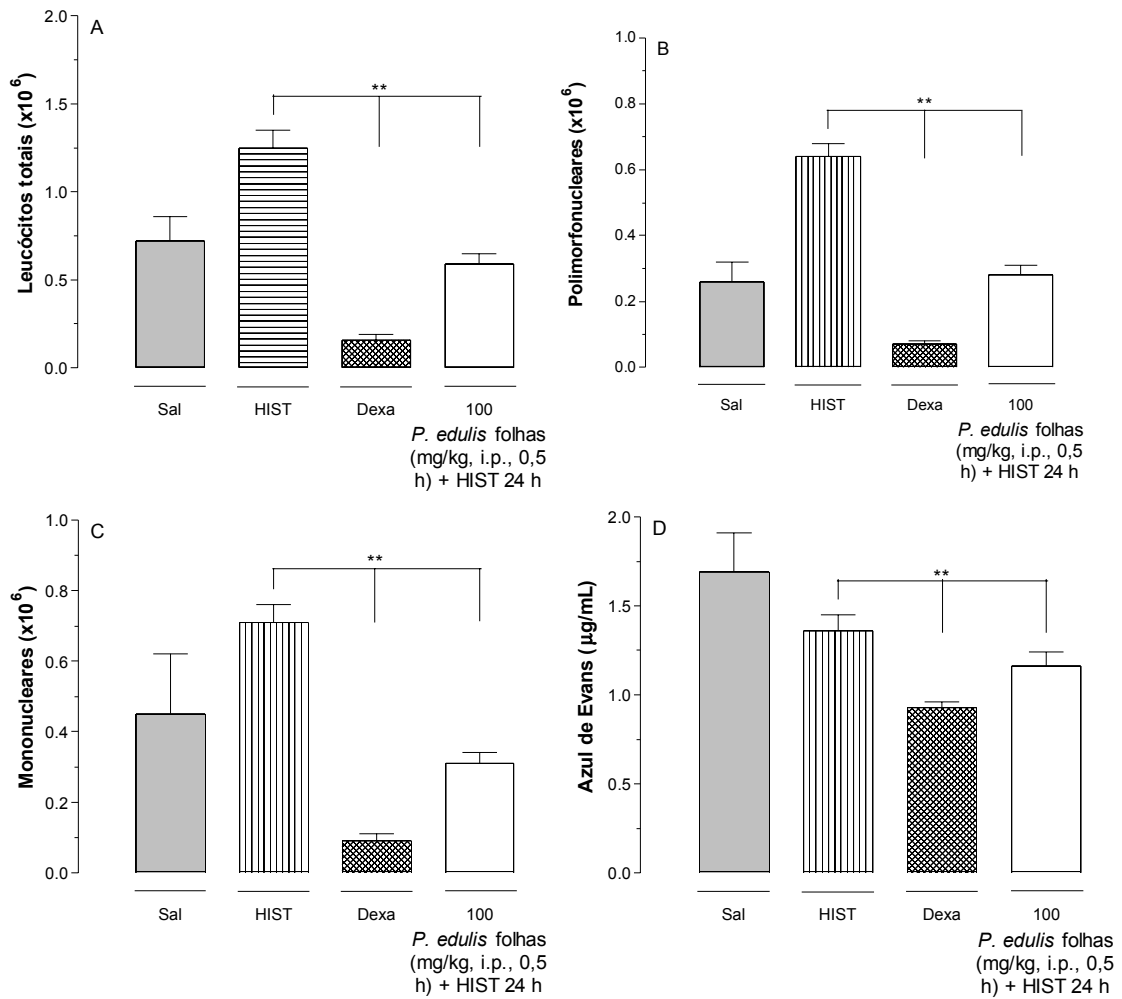
Extrato e dose (mg/kg, i.p., 0,5 h)	Bradicinina (% de inibição)	Histamina (% de inibição)	Substância P (% de inibição)
<b>Leucócitos totais</b>			
<i>P. edulis</i> folhas 100	$47 \pm 3^{**}$	$53 \pm 4^{**}$	$60 \pm 2^{**}$
Dexa 0,5	$60 \pm 4^{**}$	$87 \pm 2^{**}$	$91 \pm 2^{**}$
<b>Polimorfonucleares</b>			
<i>P. edulis</i> folhas 100	$51 \pm 2^{**}$	$56 \pm 4^{**}$	$32 \pm 6^{**}$
Dexa 0,5	$84 \pm 3^{**}$	$89 \pm 2^{**}$	$90 \pm 2^{**}$
<b>Mononucleares</b>			
<i>P. edulis</i> folhas 100	$35 \pm 6^{**}$	$57 \pm 4^{**}$	$57 \pm 3^{**}$
Dexa 0,5	-	$87 \pm 2^{**}$	$90 \pm 2^{**}$
<b>Exsudação</b>			
<i>P. edulis</i> folhas 100	-	$29 \pm 5^{**}$	$48 \pm 10^*$
Dexa 0,5	-	$43 \pm 2^{**}$	$68 \pm 4^{**}$

Cada grupo representa a média das percentagens  $\pm$  e.p.m. de 4 a 6 animais. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com um dos agentes flogísticos e os demais grupos. Dexa = dexametasona.

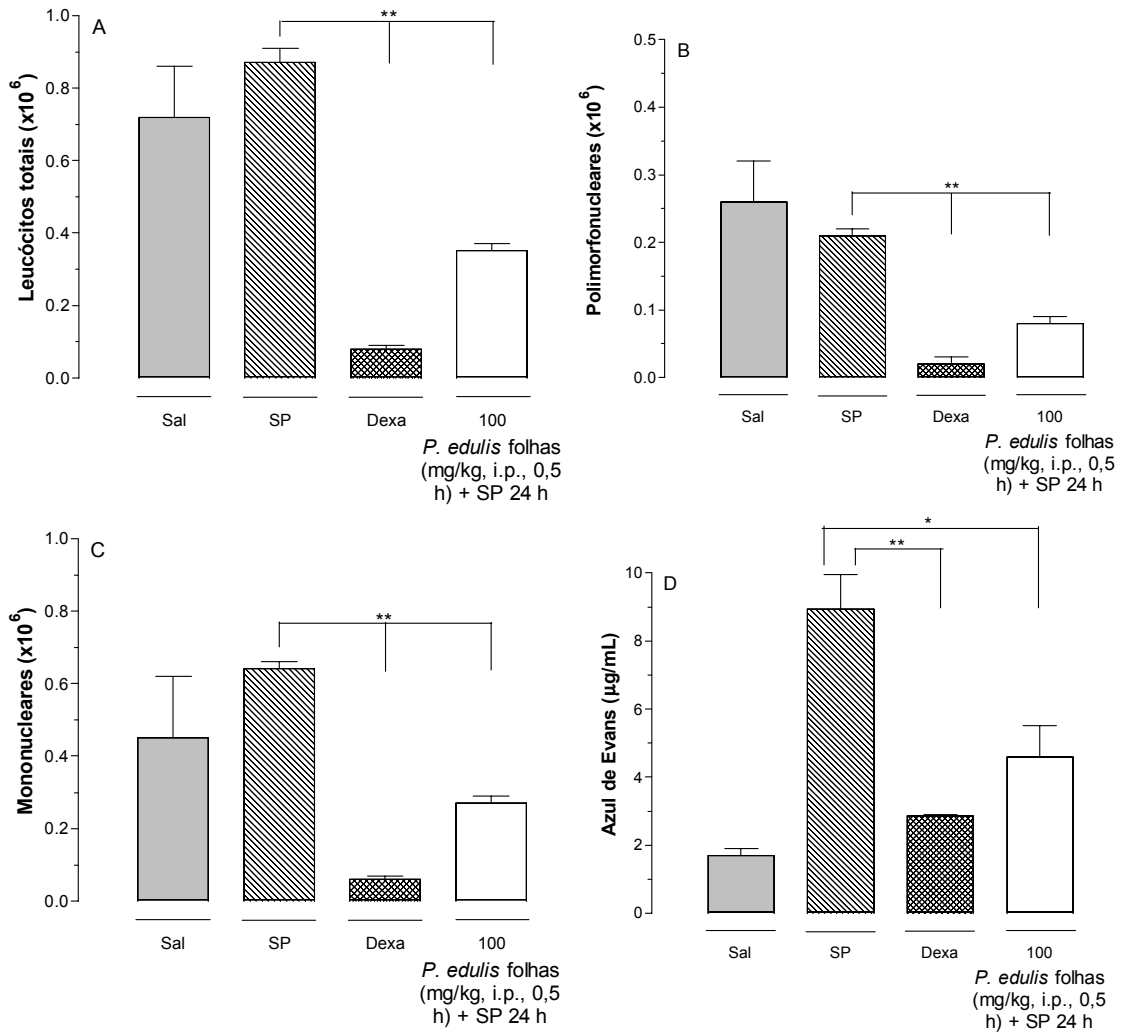




**Figura 15:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da bradicinina (BK 20 nmol/cav.) no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, s.c.). BK = Animais tratados apenas com bradicinina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (duas doses de 0,5 mg/kg, i.p.) e bradicinina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \* P < 0,05 e \*\* P < 0,01 representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a bradicinina e os demais grupos.



**Figura 16:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da histamina (HIST 10  $\mu\text{mol/cav.}$ ) no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, s.c.). HIST = Animais tratados apenas com histamina. Dexa = Animais tratados com dexametasona (duas doses de 0,5 mg/kg, i.p.) e histamina. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \*\*  $P < 0,01$  representa a significância da diferença entre o grupo tratado com a histamina e os demais grupos.



**Figura 17:** Efeito do extrato *P. edulis* folhas (100 mg/kg, i.p.) administrado 0,5 h antes da substância P (SP 40 nmol/cav.) no modelo da bolsa de ar em camundongos, sobre os níveis de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B), mononucleares (C) e exsudação (D). Sal = Animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%, s.c.). SP = Animais tratados apenas com substância P. Dexa = Animais tratados com dexametasona (duas doses 0,5 mg/kg, i.p.) e substância P. Cada grupo representa uma média de 4 a 6 animais e a barra vertical o e.p.m. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  representam a significância da diferença entre o grupo tratado com a substância P e os demais grupos.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para melhor elucidar o mecanismo de ação antiinflamatório da espécie *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener.

Para avaliar a atividade e o mecanismo de ação antiinflamatório dos extratos de *P. edulis*, utilizou-se os modelos da pleurisia e da bolsa de ar induzidos por diferentes agentes flogísticos.

Na pleurisia e na bolsa de ar observa-se uma significativa resposta inflamatória 4 e 24 h, respectivamente, após a indução da inflamação pela carragenina. Nesta fase ocorre um aumento de leucócitos do tipo polimorfonucleares, aumento da atividade das enzimas mieloperoxidase e adenosina-deaminase, aumento dos níveis dos metabólitos do óxido nítrico (nitrito e nitrato), aumento da exsudação em nível local e ainda participação de citocinas do tipo pró-inflamatórias (FERRANDIZ *et al.*, 1996; SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996; SIN, *et al.*, 1997; SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1999; FRÖDE e MEDEIROS, 2001; FRÖDE, SOUZA, CALIXTO, 2002; GARCÍA-RAMALLO *et al.*, 2002; DALMARCO, FRODE, MEDEIROS, 2002, 2004; DA SILVA, FARGES, FRÖDE, 2004; KOO *et al.*, 2005). Pelo fato exposto acima, estes modelos são utilizados na triagem de plantas e/ou novos fármacos com atividade antiinflamatória.

Ao avaliar os diferentes extratos de *P. edulis* (folhas, raízes e pericarpo) foi observado que as folhas demonstraram um efeito antiinflamatório importante e mais eficaz, inibindo mediadores da inflamação bem como os leucócitos e os polimorfonucleares envolvidos na resposta inflamatória nos modelos de inflamação estudados.

As diferentes respostas dos efeitos observados com os extratos estudados (folhas, raízes e pericarpo) podem ser explicados pelo fato que estes extratos apresentam variações em sua composição química, as quais podem explicar as diferenças observadas quanto à inibição dos parâmetros inflamatórios avaliados nos diferentes modelos de inflamação estudados.

Os estudos realizados no laboratório de Química Farmacêutica/UFSC pela mestranda Silvana M. Zucolotto utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada demonstraram que o extrato das folhas possui os seguintes componentes: flavonóides C-glicosilflavonas (orientina e isoorientina). No extrato do

pericarpo dos frutos maduros também foi observada a presença de flavonóides C-glicosídeos, semelhante às folhas, mas em menor teor. Já no extrato das raízes não foi observado a presença desses compostos.

Outros trabalhos realizados por Petry *et al.* (2001) e De-Paris *et al.* (2002) demonstraram que o extrato de *Passiflora edulis* Sims, outra variação da espécie *Passiflora edulis* possui concentrações de flavonóides variando de 4,04 a 4,60%.

De forma geral estes resultados, em conjunto, revelam que os flavonóides são substâncias importantes e presentes nestas duas variações de *Passiflora edulis* e talvez estes sejam um dos principais componentes responsáveis pelo efeito antiinflamatório do extrato observado nos experimentos realizados.

Em nossos experimentos os extratos das folhas e raízes quando administrados por via intraperitoneal, foram eficazes em inibir a migração de leucócitos para a cavidade inflamada principalmente às custas de polimorfonucleares. Uma vez que o extrato das folhas foi mais eficaz em inibir a migração leucocitária no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, todos os demais experimentos para avaliação do mecanismo de ação antiinflamatório da *P. edulis* foram realizados utilizando-se somente o extrato obtido das folhas.

Dentre as hipóteses que podem estar relacionadas à inibição da migração leucocitária observada nos animais inflamados e tratados previamente com o extrato das folhas de *P. edulis* podemos destacar a inibição da produção e/ou liberação de substâncias pró-inflamatórias relacionadas à quimiotaxia de leucócitos.

Nos nossos experimentos o envolvimento de vários mediadores pró-inflamatórios e considerados quimiotáticos foram estudados: as citocinas do tipo pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2 e KC), bem como a bradicinina, a histamina, a substância P e o óxido nítrico.

O extrato *P. edulis* folhas foi efetivo em diminuir os níveis de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no modelo da pleurisia e IL-1 $\beta$  e MIP-2 no modelo da bolsa de ar, ambos induzidos por carragenina. Neste contexto, podemos supor que a diminuição dos leucócitos pode ser devida à diminuição dos níveis destes mediadores pró-inflamatórios citados anteriormente.

O TNF $\alpha$  é produzido e liberado principalmente por macrófagos e também por linfócitos e mastócitos (ALVES e RIBEIRO, 2004). Já a IL-1 $\beta$  é produzida por macrófagos, células endoteliais e epiteliais e por linfócitos (ALVES e RIBEIRO, 2004). Estas células (leucócitos) que migram para o foco da inflamação ou aquelas consideradas residentes (macrófagos) liberam as citocinas a partir de um estímulo como, por exemplo, a carragenina administrada na cavidade pleural ou na bolsa de ar, em camundongos (FRÖDE, SOUZA, CALIXTO, 2001; SIN *et al.*, 1997).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o TNF $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a MIP-2 são potentes agentes quimiotáticos para leucócitos. Dentre eles destaca-se o estudo realizado por Butler e colaboradores (2005) o qual demonstraram que o TNF $\alpha$  estimulou a quimiotaxia de neutrófilos, em cultura de células endoteliais de veias umbilicais humanas.

Zhang e colaboradores (2001), utilizando a metodologia de microscopia intravital, observaram também que o TNF $\alpha$  induziu a expressão de MIP-2 e KC promovendo desta forma a migração de leucócitos e de polimorfonucleares para o músculo cremaster de camundongos machos.

No modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, já foi relatado que tanto a IL-1 $\beta$  como o TNF $\alpha$  promoveram aumento de leucócitos e de neutrófilos no lavado pleural dos camundongos inflamados (FRÖDE, SOUZA, CALIXTO, 2001). Já no modelo da bolsa de ar, também em camundongos, a administração de TNF $\alpha$  e MIP-2 na bolsa de ar foi capaz de induzir a migração de leucócitos do tipo polimorfonucleares para o local de inflamação (SCHRAMM, LIU, THORLACIUS, 2000).

Em humanos, o TNF $\alpha$  é um dos responsáveis pela migração de leucócitos para as articulações, em pacientes com artrite reumatóide. Estudos já têm demonstrado o efeito benéfico da terapia com anticorpos anti-TNF $\alpha$  em pacientes com artrite reumatóide. Den Broeder e colaboradores (2003), através de estudos por cintilografia, demonstraram que o anticorpo anti-TNF $\alpha$  diminuiu o influxo de leucócitos para as articulações inflamadas de pacientes com artrite reumatóide. Os fármacos etanercept e infliximab, bloqueadores seletivos do receptor para TNF $\alpha$ , já são utilizados na terapia de artrite reumatóide sendo o último comercializado no Brasil (LAURINDO *et al.*, 2002).

A IL-1 também participa da fisiopatologia da artrite reumatóide, estudos em humanos demonstraram que o tratamento com a IL-1Ra recombinante reduz a lesão à cartilagem na artrite reumatóide (JIANG *et al.*, 2000). Estudos clínicos com anakinra (antagonista recombinante humano do receptor da IL-1) demonstraram também sua eficácia e segurança no tratamento de pacientes com artrite reumatóide (NUKI *et al.*, 2002), sendo que este medicamento já foi aprovado para uso, em humanos na Europa e nos Estados Unidos (LAURINDO *et al.*, 2002).

Além disso, estas citocinas (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) também induziram a expressão de ICAM-1, que são responsáveis pela migração leucocitária, em cultura de células epiteliais de brônquios humanos (SUBAUSTE, CHOI, PROUD, 2001). Além disso, o TNF $\alpha$  aumentou os níveis de RNAm para MIP-2 e KC, no modelo de microscopia vital no músculo cremaster de camundongos, promovendo a quimiotaxia de polimorfonucleares (ZHANG *et al.*, 2001).

Atualmente muitos estudos têm sido direcionados às moléculas de adesão. Dentre estes estudos pode-se citar: aqueles realizados por Jiang e colaboradores (2004 e 2005) pelo qual demonstraram que o TNF $\alpha$  é capaz de induzir a expressão de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, em culturas de células endoteliais da microvasculatura pulmonar e dérmica humana. A expressão dessas moléculas foi inibida pelo tratamento com a pirrolidinaditiocarbamato, via inibição do NF $\kappa$ B. Além disso, o TNF $\alpha$  também foi capaz de induzir a expressão de CD11a e CD11b em neutrófilos no modelo da microscopia vital em vênulas mesentelial de ratos (SALAS *et al.*, 2000).

Em cultura de células endoteliáis de veias umbilicais humanas, a IL-1 $\beta$  também induziu a expressão de moléculas de adesão do tipo E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (ZERWES *et al.*, 2002). Em 2000, Krakauer demonstrou que a IL-1 $\beta$  foi efetiva em induzir a expressão de ICAM-1, liberação de IL-8 e proteína quimiotática de monócito-1 em cultura de células A549 (linhagem de células epiteliáis pulmonares humanas).

A citocina pró-inflamatória MIP-2 também foi capaz de estimular o recrutamento de neutrófilos na medula óssea do fêmur de ratos e este recrutamento foi independente da expressão de L-selectina e CD11 e dependente da expressão de CD49d, nos neutrófilos (BURDON, MARTIN,

RANKIN, 2005). Em outro estudo realizado por Matzer e colaboradores (2004) observou-se que antagonista não peptídico do receptor CXCR2 de citocinas bloqueou a migração de neutrófilos induzida por MIP-2, em camundongos. No modelo da pleurisia induzida por MIP-2 também foi relatado que este induziu a migração de leucócitos para o sítio de inflamação (MIOTLA, RIDGER, HELLEWELL, 2001).

A bradicinina, a histamina, a substancia P e o óxido nítrico são outros mediadores também do tipo pró-inflamatórios relacionados também à quimiotaxia celular.

O extrato *P. edlius* folhas também foi efetivo em inibir a migração de leucócitos para as cavidades inflamadas por bradicinina, nos dois modelos experimentais estudados.

A bradicinina é um dos principais mediadores da inflamação liberada por meio da ativação da cascata cinina-caliceína. Além disso, este mediador é capaz de promover além da exsudação o aumento de leucócitos para o sítio da resposta inflamatória.

Estudos *in vitro* realizados com este mediador e agonistas seletivos para seus receptores, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, foram eficazes em aumentar a migração de polimorfonucleares humanos de forma dependente da dose (PAEGELOW *et al.*, 2002). Este mediador promoveu também o aumento de leucócitos no modelo da pleurisia em camundongos, mais uma vez este efeito observado foi dependente da dose e do tempo (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1997). A bradicinina também promoveu aumento dos neutrófilos e dos níveis de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  quando administrado na bolsa de ar de ratos (SANTOS, CALIXTO, SOUZA, 2003). Camundongos deficientes para o receptor B<sub>1</sub> da bradicinina, mostraram uma diminuição da resposta inflamatória (migração de leucócitos e exsudação) no modelo da pleurisia induzida por des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (PESQUERO *et al.*, 2000). Ainda nestes experimentos, observou-se também diminuição da migração de polimorfonucleares quando a pleurisia foi induzida por carragenina (PESQUERO *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos por este estudo demonstraram ainda que o extrato de *P. edulis* folhas foi efetivo em inibir a migração leucocitária para as cavidades pleural e da bolsa de ar inflamadas por histamina.



A histamina é uma amina básica formada a partir da histidina, armazenada em grânulos intracelulares, sendo liberada principalmente de mastócitos após traumas e processos inflamatórios. Este mediador atua ainda no recrutamento de neutrófilos em vários modelos de inflamação. Dentre estes estudos cita-se o de Yamashiro e colaboradores (2001) pelo qual demonstraram que a histamina foi capaz de induzir o *rolling* de leucócitos nas veias da retina de ratos quando administrada por via intraorbital. Da Cunha e colaboradores (2001) utilizaram a histamina como agente flogístico, induzindo a migração leucocitária, no modelo da pleurisia em camundongos. Saleh, Calixto e Medeiros (1999) demonstraram também a participação de histamina, via a ativação de seu receptor H<sub>1</sub>, no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos. Este efeito foi observado quando os animais inflamados foram tratados com terfenandina, antagonista seletivo de receptores H<sub>1</sub>, pelo qual observou-se inibição da migração de leucócitos e de polimorfonucleares na cavidade pleural de animais com pleurisia.

Outro estudo *in vitro* mostra a participação da histamina, via ativação do receptor H<sub>2</sub>, na liberação de elastina, produção de superóxido, influxo de cálcio intracelular e expressão das moléculas de adesão CD11b e CD18 em neutrófilos humanos ativados por formil-metionileucil-feilalanine (OKAJIMA *et al.*, 2000). Este mesmo estudo relata ainda o acúmulo de neutrófilos, no modelo de lesão gástrica induzida por estresse, em ratos.

Além disso, estudos demonstraram o envolvimento da histamina, via ativação de receptores H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>, no recrutamento de neutrófilos no modelo da peritonite e da pleurisia, ambos induzidos por zimosan, em camundongo (TAKESHITA *et al.*, 2003; THURMOND *et al.*, 2004). A histamina ainda está presente na infiltração de neutrófilos, nos modelos da peritonite induzida por zimosan, em camundongos e na colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico, em ratos. Estes efeitos parecem estar relacionados à ativação do receptor H<sub>4</sub> (THURMOND *et al.*, 2004; VARGA *et al.*, 2005).

Em nossos experimentos observamos também que o extrato de *P. edulis* folhas mais uma vez inibiu de forma significativa a migração de leucócitos para as cavidades pleural e da bolsa de ar na inflamação induzida pela substância P. Nestes experimentos em particular, o extrato inibiu também, em menor grau, a exsudação induzida por este agente flogístico.

Estudos realizados por Fröde-Saleh, Calixto e Medeiros (1999) demonstraram que a substância P foi capaz de induzir a inflamação no modelo da pleurisia em camundongos. Neste modelo houve aumento da exsudação e da migração de leucócitos para a cavidade pleural inflamada. Este mediador induziu também a inflamação, caracterizada por vasodilatação, aumento da migração de leucócitos e edema, no modelo experimental de cistite induzida por lipopolissacarídeo, em camundongos (SABAN *et al.*, 2002). Souza e colaboradores (2002) demonstraram o envolvimento da substância P, via ativação do receptor NK<sub>1</sub>, no aumento da permeabilidade vascular, produção/liberação de TNF $\alpha$  e recrutamento de neutrófilos no intestino e pulmão de ratos, no modelo de isquemia/reperfusão intestinal. Estudo realizado por Joachim e colaboradores (2004) demonstraram ainda que a substância P, via ativação do seu receptor NK<sub>1</sub>, também aumentou o recrutamento de leucócitos, em camundongos submetidos ao estresse, no modelo de inflamação alérgica das vias aéreas.

A infusão de substância P, via ativação do receptor NK<sub>1</sub>, promoveu aumento da exsudação no pâncreas de ratos (MAA *et al.*, 2000). Grady e colaboradores (2000) também demonstraram que a substância P e a [Sar<sup>9</sup> Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substância P, agonista do receptor NK<sub>1</sub>, foram efetivos em induzir a exsudação também no pâncreas de ratos e camundongos.

Outro mediador importante e que vem sendo muito estudado nos últimos anos é o óxido nítrico. Em nosso protocolo experimental observamos o efeito inibitório da *P. edulis* folhas sobre os níveis de nitrato/nitrito liberados na inflamação nos modelos de pleurisia e bolsa de ar induzidos por carragenina.

O óxido nítrico é um dos principais agentes fisiológicos vasodilatadores conhecidos (McMACKIN e VITA, 2005). No entanto possui um papel importante também na migração de leucócitos em modelos de inflamação. Neste contexto, Rodrigues-Bastos e colaboradores (2004) demonstraram que na pleurisia induzida por *Mycobacterium bovis* em camundongos C57Bl/6, observou-se aumento da migração de leucócitos às custas de polimorfonucleares e níveis elevados de óxido nítrico. Porém nenhuma alteração na celularidade foi observada neste modelo quando utilizou-se animais deficientes em NOSi. Cardell, Agusti e Nadel (2000) demonstraram também que o leucotrieno B<sub>4</sub> foi efetivo em aumentar a secreção e o recrutamento de neutrófilos nas vias aéreas de cães. Este efeito foi inibido quando os animais foram tratados com L-NAME, inibidor seletivo para NOS. Já no modelo

do edema de pata induzido por enterotoxina B de *Staphylococcus*, em camundongos, observou-se aumento da exsudação e dos níveis de mieloperoxidase, indicando a presença de leucócitos ativados. O edema e a atividade de mieloperoxidase foram inibidos quando os animais receberam tratamento prévio com L-NAME ou aminoguanidina, por via intravenosa ou subplantar (FRANCO-PENTEADO *et al.*, 2001). Outros estudos ainda relataram que na pleurisia induzida por carragenina ocorreu aumento da migração de leucócitos e dos níveis de metabólitos do óxido nítrico (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1999; DALMARCO, FRÖDE, MEDEIROS, 2002; 2004).

Em um estudo utilizando células endoteliais de aorta humana pré-tratadas com insulina os autores demonstraram aumento, dependente da dose, nas concentrações de NOSe e inibição na expressão de RNAm para ICAM-1. O tratamento destas células com L-NNA, inibidor da NOS, aumentou a expressão de ICAM-1 (ALJADA *et al.*, 2000).

Na verdade não sabemos se o conjunto dos compostos ou se algum composto específico seria o responsável por estes efeitos inibitórios da migração celular diretamente ou via inibição de mediadores quimiotáticos.

No entanto, dentre as substâncias mais estudadas e presentes em nosso extrato de *P. edulis* folhas destacam-se os flavonóides. Existem vários trabalhos demonstrando o efeito antiinflamatório dos flavonóides. Dentre estes trabalhos citamos aquele realizado por Wadsworth, McDonald e Koop (2001) pelo qual observaram que a quercetina inibiu a expressão de RNAm para TNF $\alpha$  em cultura de macrófagos RAW 264.7 após estimulação por lipopolissacarídeo. Outro estudo utilizando a nobiletina demonstrou que este flavonóide inibiu a expressão de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  em macrófagos de camundongos J774.A1 estimulados também por lipopolissacarídeo (LIN *et al.*, 2003).

Estudos também relataram os efeitos de flavonóides sobre a expressão de moléculas de adesão. Kotanidou e colaboradores (2002) observaram que a luteolina inibiu significativamente a expressão de ICAM-1 em células hepáticas de camundongos no modelo de peritonite induzida por lipopolissacarídeo. Já Takano-Ishikawa, Goto, e Yamaki (2003) descreveram efeitos semelhantes dos flavonóides fisetina, luteolina, apigenina, kaempferol, quercetina, eriodictiol, genisteína e buteína

sobre a expressão da E-selectina, em células endoteliais de veias umbilicais humanas estimuladas por  $\text{TNF}\alpha$ .

Vários estudos relataram que os flavonóides como por exemplo: kaempferol 3-O-gentiobioside, vogonina, ganuangenina, vogonosida, 3,5,7,2',6'-pentaidroxil flavanona e luteolina-7-O-retinosida inibiram a liberação de histamina em mastócitos peritoneais de ratos e em células do exsudato peritoneal de ratos induzidos pela concavalin A, A23817 e composto 48/80 (INOUE *et al.*, 2002; LIM *et al.*, 2003; MORIYAMA *et al.*, 2003).

O flavonóide ternatina demonstrou ser efetivo em inibir também a liberação de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos *ex vivo* estimulados por lipopolissacarídeo (RAO *et al.*, 2003). Os biflavonóides bilobetina e ginkgetina foram eficazes também em inibir a produção de óxido nítrico em cultura de células RAW 264.7 (macrófagos de camundongos) induzidas por lipopolissacarídeo. Esta inibição ocorreu via inibição da enzima NOSi (CHEON *et al.*, 2000). O flavonóide vogonina também foi efetivo em inibir a produção de óxido nítrico, através da inibição da expressão de NOSi, em cultura de células RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeo (VAN DIEN *et al.*, 2001).

Uma vez observado a inibição de leucócitos, principalmente de polimorfonucleares nos modelos de inflamação estudados, outro passo importante foi avaliar as enzimas leucocitárias responsáveis pela ativação destas células. Estudamos a mieloperoxidase e a adenosina-deaminase, enzimas consideradas marcadores de neutrófilos ou mononucleares, respectivamente (KLEBANOFF *et al.*, 1999; WINTERBOURN, VISSERS, KETLE, 2000; GASSER *et al.*, 2003).

Os nossos resultados demonstraram que o extrato *P. edulis* folhas inibiu de forma significativa os leucócitos às custas de polimorfonucleares e a atividade da mieloperoxidase, nos exsudatos pleural e da bolsa de ar de animais inflamados com carragenina. Este fato evidencia mais uma vez os efeitos antiinflamatórios deste extrato.

A importância desta enzima é observada em estudos utilizando-se camundongos *knockout* para a molécula de adesão P-selectina pelo qual observou-se que estes animais apresentaram diminuição significativa da atividade da mieloperoxidase, indicando inibição do influxo de neutrófilos ativados, no modelo de falência renal induzida por isquemia/reperfusão, em camundongos (SINGBARTL, GREEN, LEY, 2000).

A atividade antiinflamatória de fármacos/extratos pode se dar devido a inibição da mieloperoxidase. Neve, Parij e Moguelevsky (2001) demonstraram que fármacos antiinflamatórios não esteroidais como indometacina, diclofenaco, piroxicam e o sulindaco foram efetivos em inibir o sistema de geração de espécies reativas de oxigênio, via mieloperoxidase.

Mais uma vez, existem estudos que relataram que os flavonóides são capazes de inibir a enzima mieloperoxidase. Estudos realizados por De Sousa e colaboradores (2004) utilizando a kaempferitrina demonstraram que este flavonóide foi efetivo em inibir os níveis de mieloperoxidase em células pulmonares de ratos, no modelo de diabetes induzido por aloxano. Já a silimarina foi capaz de inibir a atividade da enzima mieloperoxidase induzida por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato na pele em camundongos (ZHAO, SHARMA, AGARWAL 1999).

Outro foco para a avaliação antiinflamatória do extrato *P. edulis* folhas foi seu efeito sobre a atividade da enzima adenosina-deaminase. No presente trabalho, demonstramos que o extrato *P. edulis* folhas inibiu significativamente a atividade da adenosina-deaminase nos fluidos pleural e da bolsa de ar de animais inflamados com carragenina.

A atividade da enzima adenosina-deaminase é proporcional à concentração do autacóide adenosina que se encontra aumentada em condições de lesão tecidual como na inflamação, onde as células ativadas liberam grandes quantidades deste autacóide (BLACKBURN, 2003). A ação da adenosina-deaminase é importante na manutenção do equilíbrio entre: produção/liberação e degradação da adenosina. Em certas circunstâncias a adenosina-deaminase pode alterar a concentração extracelular de adenosina, pela sua degradação (HITOGLOU *et al.*, 2001; YONEYAMA *et al.*, 2002).

Os efeitos observados pela ação da adenosina são pleiotrópicos e dependentes da ativação de receptores. Os seguintes receptores já foram caracterizados: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (FREDHOLM *et al.*, 2001; LINDEN, 2001). Estudos evidenciaram o envolvimento de altas concentrações de adenosina na inflamação pulmonar, demonstrando a deposição de colágeno e a alteração da estrutura de vias aéreas de camundongos deficientes de adenosina-deaminase (CHUNN *et al.*, 2005a, b).

Em 2004, Lee e colaboradores utilizando camundongos *knockout* para o receptor A<sub>1</sub> da adenosina demonstraram aumento nos níveis de mieloperoxidase, IL-

1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e ICAM-1 nos rins destes animais, no modelo de isquemia/reperfusão renal. Já os camundongos selvagens tratados com um antagonista seletivo para o receptor A<sub>1</sub> (1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina) também demonstraram: aumento da atividade de mieloperoxidase, infiltração de neutrófilos, expressão de ICAM-1 e aumento nos níveis das citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no modelo de isquemia/reperfusão nos rins de camundongos.

Um novo enfoque para a atividade antiinflamatória de novos fármacos está baseado na ativação de receptores A<sub>2A</sub> da adenosina (CRISTALLI *et al.*, 2003; SULLIVAN, 2003). Estudos realizados por Sullivan e colaboradores (2004) demonstraram que a ativação de receptores A<sub>2A</sub> inibiu a expressão da molécula de adesão do tipo integrina (VLA-4) de neutrófilos humanos estimulados por lipopolissacarídeo ou TNF $\alpha$  e formil-met-leu-phe. Fozard e colaboradores (2002) também demonstraram que a ativação dos receptores A<sub>2A</sub>, por meio de um agonista seletivo (CGS 21680) inibiu de forma dependente da dose o número de leucócitos, a concentração de proteínas totais e a atividade da mieloperoxidase, no lavado broncoalveolar de ratos sensibilizados com ovoalbumina, no modelo de inflamação alérgica. Este efeito de inibição foi revertido quando os animais foram tratados com antagonistas seletivos para o receptor A<sub>2A</sub>, ZM 241385.

A adenosina e o agonista para o receptor A<sub>2B</sub>, NECA, *in vitro*, reduziram de forma significativa a migração de leucócitos em células endoteliais de veia umbilical humana, ativados por TNF $\alpha$ . Neste protocolo experimental, o autacóide ainda foi capaz de inibir a liberação do fator de permeabilidade vascular para neutrófilo (VEGF) de forma dependente da dose. Além disso, observou-se que os efeitos citados foram revertidos pelo 3,7-dimetil-1-propargilxantina, um antagonista dos receptores A<sub>2</sub> (WAKAI *et al.*, 2001).

O IB-MECA, agonista seletivo do receptor A<sub>3</sub>, promoveu redução significativa na infiltração de leucócitos para o intestino, no modelo de inflamação intestinal induzida por dextran, em camundongos. Neste protocolo, também foi observada a inibição significativa no metabolismo oxidativo associado à infiltração celular, aumento de peso e redução no sangramento pelas fezes de camundongos com colite induzida por dextran (MABLEY *et al.*, 2003).

De uma forma geral, os leucócitos foram inibidos pelo extrato *P. edulis* folhas na inflamação induzida por diferentes agente flogísticos. Além disso, as citocinas

pró-inflamatórias  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{MIP-2}$  também foram inibidas. Sabe-se que a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como as citocinas e óxido nítrico, ocorre via ativação de fatores de transcrição nuclear, cita-se:  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ .

O  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  é alvo de muitos estudos devido ao seu papel central na regulação da expressão de genes que codificam moléculas pró-inflamatórias, dentre elas: as citocinas ( $\text{IL-1}$ ,  $\text{IL-6}$  e  $\text{TNF}\alpha$ ), quemocinas ( $\text{IL-8}$ ), moléculas de adesão ( $\text{ICAM-1}$ ) (CHRISTMAN, SADIKOT, TURUTIN *et al.*, 2003) e enzimas ( $\text{iNOS}$  e ciclooxygenas-2) (CHRISTMAN, SADIKOT, BLACKWELL, 2000). Desta forma, podemos destacar que a regulação e o controle da ativação do fator  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , pode ser uma estratégia terapêutica na inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios e da expressão de moléculas de adesão (BREMER e HEINRICH, 2002; ZINGARELLI, SHEEHAN, WONG, 2003).

Neste contexto, trabalho realizado por Ishikawa e colaboradores (1999) demonstrou que o flavonóide quercetina inibiu a produção da proteína quimiotática para monócitos-1, via inibição do  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , em cultura de células mesangiais de glomérulo de ratos ativadas por  $\text{IL-1}\beta$ . Rangan e colaboradores (1999) também demonstraram que a quercetina inibiu a indução de  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , proteína quimiotática de monócito-1, proteína inflamatória de macrófago- $1\alpha$  e  $\text{MIP-2}$ , em cultura de células tubulares proximais de ratos, induzidas por lipopolissacarídeo, via supressão da indução da transcrição de proteínas pelo  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Dentre as hipóteses postuladas para este efeito, estes autores destacaram uma possível ação antioxidante do flavonóide, tendo em vista que o  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  é ativado pelo estresse oxidativo. Desta forma, os antioxidantes podem ser considerados como potenciais inibidores do  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (ZINGARELLI, SHEEHAN, WONG, 2003).

Estudos realizados por Mun'im, Negishi e Ozawa (2003) demonstraram também efeitos antioxidantes para orientina e isoorientina, nos ensaios *in vitro* utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e no ensaio da oxidação do ácido linoléico. Estes autores também demonstraram um efeito protetor destes flavonóides no efeito bactericida do radical oxidante peroxil, protegendo a bactéria *Staphylococcus aureus* dos efeitos deletérios deste oxidante. Lin e colaboradores (2002) demonstraram ainda que a isovitexina protegeu, *in vitro*, as células HL-60 da ação de espécies reativas do oxigênio produzidas pela enzima xantina-oxidase, protegeu o DNA dos danos da reação de Fenton e ainda, suprimiu significativamente

a liberação de peróxido de hidrogênio de células ovarianas A2780, induzidas pelo cádmio. Ainda é importante relatar que estudos revelaram que a maioria dos flavonóides apresentaram propriedades antioxidantes, na regulação da produção/liberação de espécies reativas do oxigênio por células fagocíticas, bem como a inibição da peroxidação lipídica em muitas moléculas biológicas, por exemplo, membranas biológicas e o DNA (MIDDLETON, KANDASWAMI, THEOHARIDES, 2000).

Por fim, os resultados obtidos em nosso trabalho demonstraram que o extrato aquoso liofilizado das folhas de *Passiflora edulis* variação *flavicarpa* Degener demonstrou importantes propriedades antiinflamatórias. Este extrato foi efetivo em inibir de forma significativa os parâmetros inflamatórios: migração de leucócitos, enzimas mieloperoxidase e adenosina-deaminase, o óxido nítrico, e a migração leucocitária induzida por bradicinina, histamina e substância P, além das citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e MIP-2, nos modelos de inflamação estudados.

O efeito antiinflamatório do extrato estudado foi mais intenso em relação à inibição dos leucócitos do que em relação à exsudação nos protocolos experimentais realizados. Neste protocolo foi observado que somente no modelo da pleurisia induzida pela substância P e na bolsa de ar induzida pela histamina ou substância P houve inibição da exsudação. Apesar destes modelos serem sensíveis ao estudo da exsudação outros experimentos utilizando outros modelos, como o edema de pata, devem ser realizados para avaliar a exsudação principalmente utilizando a histamina e/ou a substância P, como agentes flogísticos.

Uma vez que a interação entre estes mediadores e células é bastante complexa é possível termos várias hipóteses para o mecanismo de ação antiinflamatório da *P. edulis* folhas:

- 1) Inibição de fatores de transcrição nuclear pelo qual promovem a liberação de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de células residentes ou aquelas que migraram para o foco da lesão. Esta inibição promove a inibição de outros mediadores quimiotáticos, bem como a expressão de moléculas de adesão diminuindo a migração leucocitária, bem como a amplificação da cascata da inflamação;
- 2) Inibição indireta da bradicinina, histamina, substância P e óxido nítrico considerados agentes quimiotáticos;
- 3) Inibição de leucócitos ativados, uma vez que observaram-se inibição da atividade da mieloperoxidase e adenosina-deaminase;



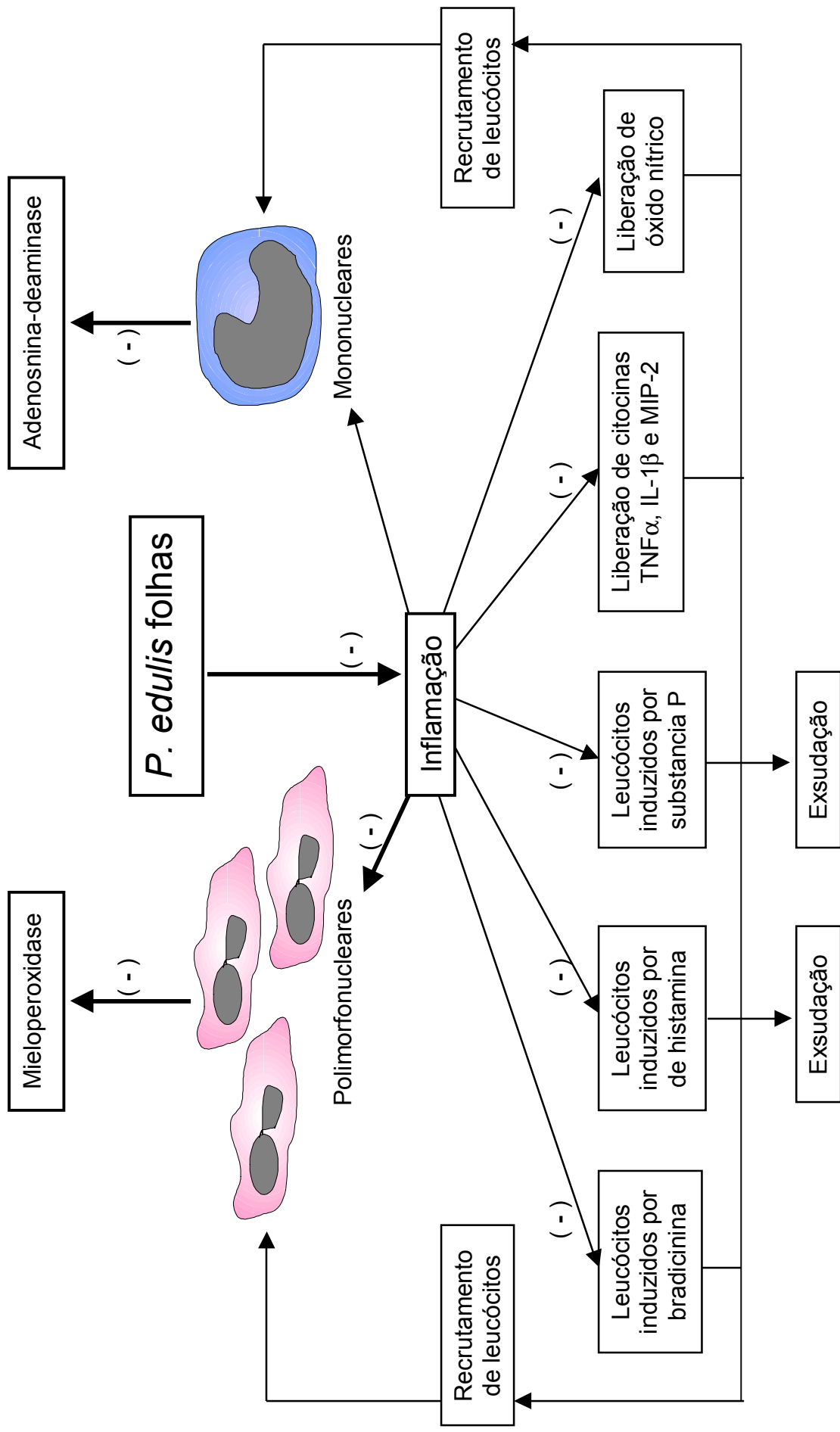
- 4) Todos estes efeitos antiinflamatórios podem ser devido a uma única substância em particular ou ao extrato como um todo, via efeitos sinérgicos entre seus constituintes.

Futuros estudos com o extrato *P. edulis* folhas, englobando a extração, separação, identificação e avaliação farmacológica de seus constituintes, poderão melhor esclarecer os efeitos antiinflamatórios observados. Além de melhor elucidar o mecanismo de ação antiinflamatório.

## 7. CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que os extratos de *P. edulis* (folhas: 250 mg/kg, i.p., 0,5 h e raízes: 500 mg/kg, i.p., 0,5 h) apresentaram efeito antiinflamatório inibindo a migração de leucócitos na pleurisia induzida pela carragenina. O mesmo não ocorreu com o extrato do pericarpo dos frutos maduros.
2. O extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h) foi o mais eficaz em inibir a inflamação do que os extratos raízes e pericarpo.
3. O extrato *P. edulis* folhas (250 mg/kg, i.p., 0,5 h) demonstrou importante efeito antiinflamatório, pois foi capaz de inibir a atividade das enzimas mieloperoxidase e adenosina-desminase e a geração direta ou indireta de mediadores pró-inflamatórios ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , MIP-2 e óxido nítrico) em dois modelos de inflamação aguda estudados.

Na figura 18 pode-se observar a hipótese do mecanismo de ação antiinflamatório do extrato *P. edulis* folhas proposto neste estudo.



**Figura 18:** Hipótese do mecanismo de ação antiinflamatório do extrato *P. edulis* folhas. IL-1β= interleucina 1 beta; MIP-2= proteína inflamatória de macrófago 2; *P. edulis*= *Passiflora edulis* variação *flav/carpa*; TNF α= fator de necrose tumoral alfa; (-) = Efeito inibitório do extrato de *P. edulis* folhas

## 8. PERSPECTIVAS

1. Estudar o efeito do extrato *P. edulis* folhas sobre a exsudação e permeabilidade vascular.
2. Estudar o efeito deste extrato sobre a expressão de moléculas de adesão CD11a/CD18.
3. Estudar o efeito deste em relação a fatores de transcrição nuclear.
4. Estudar o efeito deste sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias no pulmão e nos lavados pleural e da bolsa de ar.
5. Verificar todos estes efeitos em compostos isolados, principalmente flavonóides, a fim de verificar se existe um composto majoritário responsável pelos efeitos antiinflamatórios ou se o conjunto dos compostos é responsável por estes efeitos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, S.B.; AMIN, A.R.; CLANCY, R.M.; ATTUR, M.. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, v. 15, p. 831-845, 2001.

AKHONDZADEH, S.; NAGHAVI, H.R.; VAZIRIAN, M.; SHAYEGANPOUR, A.; RASHIDI, D.H.; KHANI, M.. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: A pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 26, p. 363-367, 2001.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G.. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, v. 357, p. 593-615, 2001.

ALDRICH, M.B.; CHEN, W.; BLACKBURN, M.R.; MARTINEZ-VALDEZ, H.; DATTA, S.K.; KELLEMS, R.E.. Impaired germinal center maturation in adenosine deaminase deficiency. *Journal of Immunology*, v. 171. p. 5562-5570, 2003.

ALJADA, A.; SAADEH, R.; ASSIAN, E.; GHANIM, H.; DANDONA, P.. Insulin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 by human aortic endothelial cells through stimulation of nitric oxide. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 85, p. 2572-2575, 2000.

ALONSO, J.R.. *Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: ISIS, 1998. p. 786-792.

ALVES, A.L.; RIBEIRO, F.A.Q.. O papel das citocinas na colesteatoma adquirido da orelha média: Revisão da literatura. *Revistas Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 70, p. 813-818, 2004.

AMARAL, K.M.; SCHENKEL, E.P.; LANGELOH, A.. Avaliação da toxicidade reprodutiva dos extratos aquosos liofilizados de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims em ratas Wistar. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 20, p. 215-220, 2001.

ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S-I.; SUZUKI, K.; KURA, F., MAEDA, N.. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 1828-1836, 1999.

AREND, W.P.. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v. 13, p. 323-340, 2002.

AOYAGI, N.; KIMURA, R.; MURATA, T.. Studies on *Passiflora incarnata* L. dry extracts. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethylmaltol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 22, p.1008-1013, 1974. Abstract.

BARAL, N.; MEHTA, K..D; CHANDRA, L.; LAMSAL, M.; RIJAL, S.; KOIRALA, S.. Adenoside deaminase activity in sera os patients with visceral leishmaniasis in Nepal. *Thopical Doctor*, v. 35, p. 86-88, 2005.

BAROCELLI, E.; BALLABENI, V.. Histamine in the control of gastric acid secretion: A topic review. *Pharmacological Research*, v. 47, p. 299-304, 2003.

BASU, A.; KYLE KRADY, J.; LEVISON, S.W.. Interleukin-1: A master regulator of neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Research*, v. 78, p. 151-156, 2004.

BLACKBURN, M.R.. Too much of a good thing: Adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, p. 66-70, 2003.

BLAIS, C.Jr.; MARCEAU, F.; GOULEAU, J.L.; ADAM, A.. The kallikrein-kininogen-kinin system: Lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides*, v. 21, p. 1903-1940, 2000.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J.. *Herbal Medicine: Expanded Commission e monographs*. Austin: American Botanical Council, 2000. p. 293-296.

BORRELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A.A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. *Phytotherapy Research*, v. 10, p. 104-106, 1996.

BREMER, P.; HEINRICH, M.. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 54, p. 453-472, 2002.

BUCKLEY, R.H.. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annual Review of Immunology*, v. 22, p. 625-655, 2004.

BURDON, P.C.E.; MARTIN, C.; RANKIN, S.M.. The CXC chemokine MIP-2 stimulates neutrophil mobilization from the rat bone marrow in a CD49d-dependent manner. *Blood*, v. 150, p. 2543-2548, 2005.

BUTLER, L.M.; RAINGER, G.D.; RAHMAN, M.; NASH, G.B.. Prolonged culture of endothelial cells and deposition of basement membrane modify the recruitment of neutrophils. *Experimental Cell Research*, v. 310, p. 22-32, 2005.

CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.. Involvement of B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *British Journal of Pharmacology*, v. 144, p. 1005-1013, 1995.

CAO, T.; PINTER, E.; AL-RASHED, S.; GERARD, N.; HOULT, Jr.; BRAIN, S.D.. Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: An *in vivo* study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *Journal of Immunology*, v. 164, p. 5424-5429, 2000.

CAPASSO, A.; SORRENTINO, L.. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of *Kava kava* and *Passiflora* extracts combination. *Phytomedicine*, v. 12, p. 39-45, 2005.

- CARDELL, L.O.; AGUSTI, C.; NADEL, J.A.. Nitric oxide-dependent neutrophil recruitment: Role in nasal secretion. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 30, p. 1799-1803, 2000.
- CARVALHO-OKANO, R.M.; VIEIRA, M.F.. Morfologia externa e taxonomia In: *Maracujá. Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C.. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 33-49.
- CAVAILLON, J.M.. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: Myth or reality. *Cellular and Molecular Biology*, v. 47, p. 695-702, 2001.
- CHAN, G.H; FISCUS, R.R.. Exaggerated production of nitric oxide (NO) and increases in inducible NO-synthase mRNA levels induced by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells of elderly rats. *Experimental Gerontology*, v. 39, p. 378-394, 2004.
- CHASSAGNE, D.; CROUZET, J.A.; BAYONOVE, C. L.; BAUMES, R. L.. Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 3817-3820, 1996.
- CHASSAGNE, D.; CROUZET, J.. A cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruit. *Phytochemistry*, v. 49, p. 757-759, 1998.
- CHAVARRIA, A.; ALCOCER-VARELA, J.. Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmunity Reviews*, v. 3, p. 251-260, 2004.
- CHENG, Z.J.; VAPAATALO, H.; MERVAALA, E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Medical Science Monitor*, v. 11, p. RA194-RA205, 2005
- CHEON, B.S.; KIM, Y.H., SON, K.S.; CHANG, H.W.; KANG, S.S.; KIM, H.P.. Effects of prenylated flavonoids and biflavonoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from the mouse macrophage cell line RAW 264.7. *Planta Medica*, v. 66, p. 596-600, 2000.
- CHI, D.S.; FITZGERALD, S.M.; PITTS, S.; CANTOR, K.; KING, E.; LEE, S.A.; HUANG, S.H.; KRISHNASWAMY, G.. MAPK-dependent regulation of IL-1- and  $\beta$ -adrenoreceptor-induced inflammatory cytokine production from mast cells: Implications for the stress response. *BMC Immunology*, v. 5, p. 22-33, 2004.
- CHRISTIANSEN, S.V.; EDDLESTON, J.; WOESSNER, K.M.; CHAMBERS, S.S; YE, R.; PAN, Z.K.; ZURAW, B.L. Up-regulation of functional kinin B1 receptors in allergic airway inflammation. *Journal of Immunology*, v. 169, p. 2054-2060, 2002.
- CHRISTMAN, J.W.; SADIKOT, R.T.; BLACKWELL, T.S.. The role of nuclear factor- $\kappa$ B in pulmonary disease. *Chest*, v. 5, p. 1482-1487, 2000.
- CHUNG, K.F.. Drugs to suppress cough. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 14, p. 19-27, 2005.

CHUNN, J.L.; MOLINA, J.G.; MI, T.; KELLEMS, R.E.; BLACKBURN, M.R.. Adenosine-dependent pulmonary fibrosis in adenosine deaminase-deficiente mice. *Journal of Immunology*, v. 175, p. 1937-1946, 2005a.

CHUNN, J.L.; MOHSENIN, A.; YOUNG, H.W.; LEE, C.G.; ELIAS, J.A.; KELLEMS, R.E.; BLACKBURN, MR.. Partially adenosine deaminase-deficient mice develop pulmonary fibrosis in association with adenosine elevations. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, in press, 2005b.

CIRINO, C.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C.. Endothelial nitric oxide synthase: The cinderella of inflammation? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, p. 91-95, 2003.

CLARK, J.M.. Uptake of colloidal thorium dioxide by the mouse connective tissue mast cell. *Texas Reports on Biology and Medicine*, v. 33, p. 397-406, 1975.

CORDELL, G.A.. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, v. 40, p. 1585-1612, 1995.

CORVOL, H.; FITTING, C.; CHADELAT, K.; JACQUOT, J.; TABARY, O.; BOULE M.; CAVAILLON, J.M.; CLEMENT, A.. Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 284, p. L997-L1003, 2003

CRISTALLI, G.; COSTANZI, S.; LAMBERTUCCI, C.; LUPIDI, G.; VITTORI, S.; VOLPINI, R.; CAMAIONI, E.. Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. *Medical Research Reviews*; v. 21, p. 105-128, 2001.

CRISTALLI, G.; LAMBERTUCCI, C.; TAIF, S.; VITTORI, S.; VOLPINI, R.. Medicinal chemistry of adenosine A2A receptor agonist. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 3, p. 387-401, 2003.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE LOO, F.A.; CAPUTI, A.P.. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 162, p. 1859-1866, 2000.

DA CUNHA, F.M.; FRÖDE, T.S.; MENDES, G.L.; MALHEIROS, A.; CECHINEL, V.; YUNES, R.; CALIXTO, J.B.. Additional evidence of the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sciences*, v. 70, p. 159-169, 2001.

DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S.. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 11, p. 299-306, 2002.

DALMARCO, E.M.; FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S.. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. *Transplat Immunology*, v. 12, p. 151-157, 2004.



DA SILVA, M.B.; FARGES, R.C.; FRÖDE, T.S.. Involvement of steroids in anti-inflammatory effects of PK11195 in a murine model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 13, p. 93-103, 2004.

DAWSON, J.; SEDGWICK, A.D.; EDWARDS, J.C.; LEES, P.. A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *International Journal of Tissue Reactions*, v. 13, p. 171-185, 1991.

DE KEYSER, F.; BAETEN, D.; VAN DEN BOSCH, F.; KRUIHOF, E.; VERBRUGGEN, G.; MIELANTS, H.; VEYS, E.. Structure-modifying capacity of anti-tumour necrosis factor-alpha therapy in ankylosing spondylitis. *Drug*, v. 64, p. 2793-2811, 2004.

DELGADO, M.; FUENTES, J.A.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S.. Histamine up-regulates phosphodiesterase IV activity in U-937 cells through H2 receptor stimulation and cAMP increase. *Medical Science Monitor*, v. 9, p. BR212-219, 2003.

DEN BROEDER, A.A.; WANTEN, G.J.; OYEN, W.J.; NABER, T.; VAN RIEL, P.L.; BARRERA, P.. Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, v. 30, p. 232-237, 2003.

DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; KAPEZINSKI, F.; ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P.. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 21, p. 5-8, 2002.

DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(r)-dirhamnoside from *Bauhinia forficatal* leaves. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 829-832, 2004.

DerMARDEROSIAN, A.. The Review of Natural Products. Saint Louis, USA: Facts and Comparisons, 2001. p. 455-458.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A.. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, p. 165-170, 2001a.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A.. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 922-926, 2001b.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A.. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 698-702, 2001c.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A.. Suppression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 239-244, 2002.

DHAWAN, K; SHARMA, A.. Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. *Fitoterapia*, v. 73, p. 397-399, 2002a.

DHAWAN, K; SHARMA, A.. Prevention of chronic alcohol and nicotine-induced azospermia, sterility and decreased libid, by a novel tri-substituted benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linneaus in healthy male rats. *Life Science*, 71, 3059-3069, 2002b.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A.. *Passiflora*: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 1-93, 2004.

DINARELLO, C.A.. Proinflammatory cytokines. *Chest*, v. 118, p. 503-508, 2000.

DI ROSA, M.; LALENTI, A.; IANARO, A.; SAUTENBIN, L.. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 54, p. 229-238, 1996.

DJUPESLAND, P.G.; CHATKIN, J.M.; QIAN, W.; HAIGHT, J.S.. Nitric oxide in the nasal airway: A new dimension in otorhinolaryngology. *American Journal of Otolaryngology*, v. 22, p. 19-32, 2001.

D'OLIVEIRA, H.V.. *Systema de Materia Medica Vegetal Brasileira*. Rio de Janeiro, Brasil: Eduardo e Henrique Laemmert, 1854. p. 58.

DONALDSON, L.F.; HASKELL, C.A., HANLEY, M.R.. Messenger RNA localization and further characterisation of the putative tachykinin receptor NK4 (NK3). *Receptors Channels*, v. 7. p. 259-272, 2001.

ELIIS, K.M.; FOZARD, J.R.. Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*, v. 22, p. 3-16, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. CUNHA, F.A.; OLIVEIRA, E.; SUASSUNA, I.; SILVA, J.A.P.; SOLLERO, L.; NOBREGA, M.A.; COSTA, P.D. (eds). 3ª Ed. São Paulo, Brasil: Andrei, 1977. p. 839-840.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N.. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, v. 5, p. 1317-1327, 2003.

FERRANDIZ, M.L.; GIL, B.; SANZ, M.L., UBEDA, A.; GONZALEZ, E.; NEGRETE, R.; PACHECO, S.; PAYA, M.; ALCARZ, M.L.. Effect of bakuchiol on leukocytes function and some inflammatory responses in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 48, p. 975-980, 1996.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; ARAUJO, R.; BADER, M.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B.. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology*, v. 43, p. 1188-1197, 2002.

FISCHER, A.; FOLKERTS, G.; GEPPETTI, P.; GRONEBERG, D.A.. Mediators of asthma: Nitric oxide. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 15, p.73-81, 2002.

FLEISCHMANN, R.; STERN, R.; IQBAL, I.. Anakinra: an inhibitor of IL-1 for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 4, p. 1333-1344, 2004.

FOZARD, J.R.; ELLIS, K.M.; VILLELA DANTAS, M.F.; TIGANI, B.; MAZZONI, L.. Effects of CGS 21680, a selective adenosine A2A receptor agonist, on allergic airways inflammation in the rat. *European Journal of Pharmacology*, v. 438, p. 183-188, 2002.

FRANÇA, S.C.. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2001. p. 105-124.

FRANCO-PENTEADO, C.F.; DESOUZA, I.; TEIXEIRA, S.A.; RIBEIRO-DA SILVA, G.; NUCCI, G.; ANTUNES, E.. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. *Biochemical Pharmacology*, v. 61, p. 1305-1311, 2001.

FRANGOGIANNIS, N.G.; SMITH, C.W.; ENTMAN, M.L.. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, v. 53, p. 31-47, 2002.

FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN J.. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 53, p. 527-52, 2001.

FRÖDE-SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. *Peptides*, v. 20, p. 259-265, 1999.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S.. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 10, p. 223-227, 2001.

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

FRÖDE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B.. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 17, p. 149-156, 2002.

GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.S.V.; SANTOS, R.R.; TOMASINI, T. *Fitoterápicos*. Campinas: André Tosello, p.17, 1996 apud GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: Aspectos biológicos,

geográficos, legais e éticos In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P., GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2001. p. 13-26.

GARCÍA-RAMALLO, E.; MARQUES, T.; PRATS, N.; BELETA, J.; KUNKEL, S.L.; GODESSART, N.. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *Journal of Immunology*, v. 169, p. 6467-6473, 2002.

GASSER, O.; HESS, C.; MIOT, S.; DEON, C.; SANCHEZ, J.C.; SCHIFFERLI, J.A.. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Experimental Cell Research*, v. 285, p. 243-257, 2003.

GAUT, J.P.; YEH, G.C.; TRAN, H.D.; BYUN, J.; HENDERSON, J.P.; RICHTER, G.M.; BRENNAN, M.L.; LUSIS, A.J.; BELAAOUAJ, A.; HOTCHKISS, R.S.; HEINECKE, J.W.. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, v. 98, p. 11961-11966, 2001.

GHANEI, M.; ASLANI, J.; BAHRAMI, H.; ADHAMI, H.. Simple method for rapid diagnosis of tuberculosis pleuritis: A statistical approach. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, v. 12, p. 23-29, 2004.

GIUSTI, G.; GALANTI, B.. Adenosine-deaminase: Colorimetric method. In: *Methods of enzymatic analyses*. BERGMAYER, H.U. (ed). New York: Verlac Chemie, 1984. p. 315.

GRADY, E.F.; YOSHIMI, S.K.; MAA, J.; VALEROSO, D.; VARTANIAN, R.K.; RAHIM, S.; KIM, E.H.; GERARD, C.; GERARD, N.; BUNNETT, N.W.; KIRKWOOD, K.S.. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 130, p. 505-512, 2000.

GREEN, I.C.; WAGNER, D.A.; GLOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.B.. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131-138, 1982.

GREMILLION, K.J.. The development of a mutualistic relationship between humans and maypops (*P. incarnata* L.) in the southeastern United States. *Journal of Ethnobiology*, v. 9, p. 135-158, 1989.

GRICE, I.D.; FERREIRA, L.A.; GRIFFITHS, L.R.. Identification and simultaneous analysis of hamane, harmine, harmol, isovitexin, and vitexin in *Passiflora incarnata* extracts with a novel HPLC method. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 24, p. 2513-2523, 2001.

GUO, F.H.; COMHAIR, S.A.A.; ZHENG, S.; DWEIK, R.A.; EISSA, N.T.; THOMASSEN, M.J.; CALHOM, W.; ERZURUM, S.C.. Molecular mechanisms of

increased nitric oxide (NO) in asthma: Evidence for transcriptional and post-translational. *Journal of Immunology*, v. 1645, p. 5970-5980, 2000.

GUPTA, M.P.. *270 Plantas medicinales iberoamericanas*. Bogotá: Convenio Andres Bello, 1995, p. 422-428.

HACKEN, N.H.T.; POSTMA, D.S.; DROK, G.; SMITH M.; KRAAN, J.; TIMENS, W.. Increased vascular expression of iNOS at day but not at night in asthmatic subjects with increased nocturnal airway obstruction. *European Respiratory Journal*, v. 16, p. 445-451, 2000.

HALKIN, A.; KEREN, G.. Potential indications for angiotensin-converting enzyme inhibitors in atherosclerotic vascular disease. *American Journal of Medicine*, v. 112, p. 126-134, 2002.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A.. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v. 13, p. 413-421, 2002.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P.. Substance P. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 33, p. 555-576, 2001.

HEDQVIST, P.; GAUTAN, N.; LINBOM, L.. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 161, p. 117-119, 2000.

HITOGLOU, S.; HATZISTILIANOU, M.; GOUGOUSTAMOU, D.; ATHANASSIADOU, F.; KOTSIS, A.; CATRIU, D.. Adenosine-deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, v. 20, p. 411-416, 2001.

HOLLOWAY, A.F.; RAO, S.; SHANNON, M.F.. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Molecular Immunology*, v. 38, p. 567-580, 2002.

HOLMGREN, S.; JENSEN, J.. Evolution of vertebrate neuropeptides. *Brain Research Bulletin*, v. 55, p. 723-735, 2001.

HOPKINS, S.J.. The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine*, v. 5, p. S45-S57, 2003.

HORIE, S.; HASEBE, K.; KOSHIKAWA, H.; TSUCHIYA, S.; YANO, S.; WATANABE, K.. Stimulatory effect of dibutyryl cyclic GMP on acid secretion in mouse isolated stomach and on histamine release in gastric mucosal cells. *Journal of Physiology*, v. 94, p. 25-29, 2000.

HSU, Y.Y.; JOU, Y.T.; WONG, R.; KARABUCAK, B.; SIMCHON, S.; KIM, S.. Effect of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) on substance P-induced vasodilatation in the dental pulp. *International Endodontic Journal*, v. 36, p. 840-847, 2003.

INOUE, T.; SUGIMOTO, Y.; MASUDA, H.; KAMEI, C.. Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 25, p. 256-259, 2002.

ISHIKAWA, Y.; SUGIYAMA, H.; STYLIANOU, E.; KITAMURA, M.. Bioflavonoid quercetin inhibits interleukin-1-induced transcriptional expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular cells via suppression of nuclear factor-kB. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 10, p. 2290-2296, 1999.

IWAKURA, Y.. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: Consideration from mouse models. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v. 13, p. 341-355, 2002.

JIANG, Y.; GENANT, H.K.; WATT, I.; COBBY, M.; BRESNIHAN, B.; AITCHISON, R.; McCABE, D.. A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: Radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis and Rheumatism*, v. 43, p. 1001-1009, 2000.

JIANG, M.Z.; TSUKAHARA, H.; OHSHIMA, Y.; TODOROKI, Y.; HIRAOKA, M.; MAEDA, M.; MAYUMI, M.. Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF- $\alpha$ -induced adhesion molecule expression and NF- $\kappa$ B activation in human dermal microvascular endothelial cells. *Life Sciences*, v. 75, p. 1159-1170, 2004.

JIANG, M.Z.; TSUKAHARA, H.; HAYAKAWA, K.; TODOROKI, Y.; TAMURA, S.; OHSHIMA, Y.; HIRAOKA, M.; MAYUMI, M.. Effects of antioxidants and NO on TNF- $\alpha$ -induced adhesion molecule expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Respiratory Medicine*, v. 99, p. 580-591, 2005.

JOACHIM, R.A.; SAGACH, V.; QUARCOO, D.; DINH, Q.T.; ARCK, P.C.; KLAPP, B.F.. Neurokinin-1 receptor mediates stress-exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Psychosomatic Medicine*, v. 66, p. 564-571, 2004.

JUFFERMANS, N.P.; FLORQUIN S.; CAMOGLIO, L.; VERBON A.; KOLK, A.H., SPEELMAN P. V.; VAN DEVENTER, S.J.; VAN DER POLL, T.. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 182, p. 902-908, 2000.

KARABUCAK, B.; WALSCH, H.; JOU, Y.T.; SIMCHON, S.; KIM, S.. The role of endothelial nitric oxide in the substance P induced vasodilation in bovine dental pulp. *Journal of Endodontics*, v. 31, p. 733-736, 2005.

KAWANO, T.; MATSUSE, H.; KONDO, Y.; MACHIDA, I., SAEKI, S.; TOMARI, S.; MITSUTA, K.; OBASE, Y.; FUKUSHIMA. C.; SHIMODA, T.; KOHNO, S.. Acetaldehyde induces histamine release from human airway mast cells to cause bronchoconstriction. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 134, p. 233-239, 2004.

KEEBLE, J.E.; BRAIN, S.D.. A role for substance P in arthritis? *Neuroscience Letters* v. 361, p. 176-179, 2004.

KIM, H.S.; KIM, W.D.; LEE, Y.H.. Production and expression of gro-alpha and RANTES by peripheral blood mononuclears cells isolated from patients with Kawasaki disease and measles. *Journal of Korean Medical Science*, v. 18, p. 381-386, 2003.

KLEBANOFF, S.J.. Myeloperoxidase. *Proceedings of the Association of American Physicians*, v. 111, p. 383-389, 1999.

KOO, H.J.; LIM, K.H.; JUNG, H.J.; PARK, E.H.. Anti-inflammatory evaluation of gardenioa extract, geniposide and genipin. *Journal of Ethnopharmacology, in press*, 2005.

KOTANIDOU, A.; XAGORARI, A.; BAGLI, E.; KITSANTA, P.; FOTSIS, E.; PAPAPETROPOULOS, A.; ROUSSOS, C.. Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression of proinflammatory molecules in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 165, p. 818-823, 2002.

KRAKAUER, T.. Pentoxifylline inhibits ICAM-1 expression and chemokine production induced by proinflammatory cytokines in human pulmonary epithelial cells. *Immunopharmacology*, v. 46, p. 253-261, 2000.

KURTZ, M.M.; WANG, R.; CLEMENTS, M.K.; CASCIERI, M.A.; AUSTIN, C.P.; CUNNINGHAM, B.R.; CHICCHI, G.G.; LIU, Q.. Identification, localization and receptor haracterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*, v. 296p. 205-212, 2002.

LANGE, U.; TEICHMANN, J.; MÜLLER-LADNER, U.; STRUNK, J.. Increase in bone mineral density of patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF- $\alpha$  antibody: A prospective open-label pilot study. *Rheumatology*, v. 44, p. 1546-1548, 2005.

LATEY, P.. Aspects of inflammation: A study of injury, healing and repetitive strain. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, v. 5, p. 124-131, 2001.

LAURINDO, I.M.M.; PINHEIRO, G.R.C.; XIMENES, A.C.; BERTOLO, M.B.; XAVIER, R.M.; GIORGI, R.D.N.; CICONELLI, R.M.; RADOMINSKI, S.C.; LIMA, F.A.C.; BATISTELA, L.M.; ALENCAR, P.. Consenso brasileiro para diagnóstico e tratamento de artrite reumatóde. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 42, p. 355-361, 2002.

LECCI, A.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; CARINI, F.; MAGGI, C.A.. Peripheral actions of thachykininis. *Neuropeptides*, v. 34, p. 303-313, 2000.

LEE, S.K.; PARK, H.S.; LIM, H.E.; KIM, S.S.; NAHM, D.H.; LEE, Y.M.; PARK, C.S.. Localization of inducible nitric oxide synthase and endothelial constitutive nitric oxide synthase in airway mucosa of toluene diisocyanate-induced asthma. *Allergy and Asthma Proceedings.*, v. 24, p. 275-280, 2003a.

LEE, J.K.; CHOI, S.S.; WON, J.S.; SUH, H.W.. The regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression induced by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-

alpha in C6 cells: Involvement of AP-1 and NFkappaB. *Life Science*, v. 73, p. 595-609, 2003b.

LEE, H.T.; XU, H.; NASR, S.H.; SCHNERMANN, J.; EMALA, C.W.. A1 adenosine receptor knockout mice exhibit increased renal injury following ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, v. 286, p. 298-306, 2004.

LEEB-LUNDBERG, L.M.F.; MARCEAU, F.; MÜLLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D.J.; ZURAW, B.L.. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews*; v. 57, p. 27-77, 2005.

LEMBECK, F.. Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, v. 219, p. 197-213, 1953.

L'HEUREUX, N.; STOCLET, J-C.; AUGER, F.A.; LAGAUD, G.J-L.; GERMAIN, L.; ANDRIANTSITOHAINA, R.. A human tissue-engineered vascular media: A new model for pharmacological studies of contractile responses. *FASEB Journal*, v. 15, p. 515-524, 2001.

LIDDLE, R.A.; NATHAN, J.D.. Neurogenic inflammation and pancreatitis. *Pancreatology*, v. 4, p. 551-559, 2004.

LIM, B.O.; CHOUE, R.W.; LEE, H.Y.; SEONG, N.S.; KIM, J.D.. Effect of the flavonoid components obtained from *Scutellaria radix* on the histamine, immunoglobulin E and lipid peroxidation of spleen lymphocytes of Sprague-Dawley rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 67, p. 1126-1129, 2003.

LIN, C.M.; CHEN, C.T.; LEE, H.H.; LIN, J.K.. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. *Planta Medica*, v. 68, p. 365-367, 2002.

LIN, N.; SATOA, T.; TAKAYAMAA, Y.; MIMAKIB, Y.; SASHIDAB, Y.; YANOC, M.; ITOA, A.. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical Pharmacology*, v. 65, p. 2065-2071, 2003.

LINDEN, J.. Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 41, p. 775-787, 2001.

LIU, L.; BURCHER, E.. Tachykinin peptides and receptors: Putting amphibians into perspective. *Peptides*, v. 26, p. 1369-1382, 2005.

LONG, C.S.. The role of interleukin-1 in the failing heart. *Heart Failure Reviews*, v. 6, p. 81-94, 2001.



LUTOMSKI, J.; MALEK, B.. Pharmacological investigations on raw materials of the genus *Passiflora*. IV. The comparison of contents of alkaloids in some harman raw materials. *Planta Medica*, v. 27, p. 381-384, 1975.

MAA, J.; GRADY, E.F.; KIM, E.H.; YOSHIMI, S.K.; HUTTER, M.M.; BUNNETT, N.W.; KIRKWOOD, K.S.. NK-1 receptor desensitization and neutral endopeptidase terminate SP-induced pancreatic plasma extravasation. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 279, p. G726-G732, 2000.

MABLEY, J.; SORIANO, F.; PACHER, P.; HASKO, G.; MARTON, A.; WALLACE, R.; SALZMAN, A.; SZABO, C.. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis. *European Journal of Pharmacology*, v. 466, p. 323-329, 2003.

MacGLASHAN, D. Jr.. Histamine: A mediator of inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 112, p. S53-S59, 2003.

MALUF, E.; BARRO, H.M.T.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BENTI, R.; LEITE, J.R.. Assesment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. *Phytotherapy Research*, v. 5, p. 262-266, 1991.

MARCHETTI, C.; PATRIARCA, P.; SOLERO, G.P.; BARALLE, F.E.; ROMANO, M.. Genetic studies on myeloperoxidase deficiency in Italy. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 57, p. S10-S12, 2004a.

MARCHETTI, C.; PATRIARCA, P.; SOLERO, G.P.; BARALLE, F.E.; ROMANO, M.. Genetic characterization of myeloperoxidase deficiency in Italy. *Human Mutation*, v. 23, p. 496-505, 2004b.

MARECK, U.; HERRMANN, K.; GALENSKA, R.; WRAY, V.. The 6-C-Chinovoside and 6-C-fucoside of luteolin from *Passiflora edulis*. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3486-3487, 1991.

MARONE, G.; GRANATA, F.; SPADARO, G.; GENOVESE, A.; TRIGGIANI, M.. The histamine-cytokine network in allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 112, p. S83-S88, 2003.

MARRIOTT, I.. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses. *Frontiers in Bioscience*, v. 9, p. 2153-2165, 2004.

MARTIN, S.W.; STEVENS, A.J.; BRENNAN, B.S.; DAVIES, D.; ROWLAND, M.; HOUSTON, J.B.. The six-day-old rat air pouch model of inflammation: characterization of the inflammatory response to carrageenan. *Journal of Pharmacology and Toxicological Methods*, v. 32, p. 139-147, 1994.

MATZER, S.P.; ZOMBOU, J.; SARAU, H.M.; ROLLINGHOFF, M.; BEUSCHER, H.U.. A synthetic, non-peptide CXCR2 antagonist blocks MIP-2-induced neutrophil migration in mice. *Immunobiology*, v. 209, p. 225-233, 2004.

McMACKIN, C.J.; VITA, J.A.. Update on nitric oxide-dependent vasodilation in human subjects. *Methods in Enzymology*, v. 396, p. 541-553, 2005.

MEDEIROS, R. CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; FERNANDES, E.S.; MORI, M.A.; PESQUERO, J.B.; BADER, M.; AVELLAR, M.C.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.. Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein. A critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathways. *Circulation Research*, v. 94, p. 1375-1382, 2004.

MIDDLETON, E.J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C.. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, v. 52, p. 73-751, 2000.

MIOTLA, J.M.; RIDGER, V.C.; HELLEWELL, P.G.. Dominant role of L- and P-selectin in mediating CXC chemokine-induced neutrophil migration in vivo. *British Journal of Pharmacology*, v. 133, p. 550-556, 2001.

MOREAU, M.V.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A.. The kallikrein-kinin system: Current and future pharmacological targets. *Journal of Pharmacological Science*, v. 99, p. 6-38, 2005.

MOREIRA, N.J.. Dicionário de Plantas Mediciniais Brasileiras. Rio de Janeiro, Brasil: Correio Mercantil, 1862. p. 144.

MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M.; MIYATAKA, H.; SATOH, T.. Antiinflammatory activity of heat-treated *Cassia alata* leaf extract and its flavonoid glycoside. *Yakugaku Zasshi*, v. 123, p. 607-611, 2003.

MORRISSEY, B.M.; SCHILLING, K.; WEIL, J.V.; SIKO, P.E.; RODMAN, D.M.. Nitric oxide and protein nitration in the cystic fibrosis airway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 406, p. 33-39, 2002.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A.. *Medicinal Plants of Brazil*. Algonac: Reference Publications, 2000, p. 267-271.

MOSSMAN, T.R.; CHEWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L.. Two types of murine helper T cell clone 1. Definitin according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, v. 136, p. 23-48, 1986.

MUN'IM, A.; NEGISHI, O.; OZAWA, T.. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 97, p. 410-414, 2003

MURPHY, P.M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I.F.; HEBERT, C.A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L.H.; OPPENHEIM, J.J.; POWER, C.A.. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 52, p. 145-176, 2000.

NAKAMACHI, Y.; KOSHIBA, M.; NAKAZAWA, T.; HATACHI, S.; SAURA, R.; KUROSAKA, M.; KUSAKA, H.; KUMAGAI, S.. Specific increase in enzymatic activity

of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis and Rheumatism*, v. 48, p. 668-674, 2003.

NATHAN, C.. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, p. 846-852, 2002.

NEUMANN, E.. Maracujá, "o must" In: *Brasília EmDia*. Brasília: Dom Quixote, 2005. p. 24.

NEVE, J.; PARIJ, N.; MOGUILVSKY, N.. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. *European Journal of Pharmacology*, v. 417, p. 37-43, 2001.

NGUYEN, C.; KATNER, H.P.. Myeloperoxidase deficiency manifesting as pustular candida dermatitis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 24, p. 258-260, 1997.

NUKI, G.; BRESNIHAN, B.; BEAR, M.B.; MCCABE, D.; EUROPEAN GROUP of CLINICAL INVESTIGATORS. Long-term safety and maintenance of clinical improvement following treatment with anakinra (recombinant human interleukin-1 receptor antagonist) in patients with rheumatoid arthritis: Extension phase of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and Rheumatism*, v. 46, p. 2338-2846, 2002.

O'CONNOR, T.M.; O'CONNELL, J.; O'BRIEN, D.I.; GOODE, T.; BREDIN, C.P.; SHANAHAN, F.. The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of Cellular Physiology*, v. 201, p. 167-180, 2004.

OGA, S.; FREITAS, P.C.D.; SILVA, A.C.G.; HANADA, S.. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Medica*, v. 51, p. 303-306, 1984.

OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; LIU, W.; UCHIBA, M.. Inhibition of neutrophil activation by ranitidine contributes to prevent stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Critical Care Medicine*, v. 28, p. 2858-2565, 2000.

OKAYA, T.; HOLTHAUS, R.; KATO, A.; LENTSCH, A.B.. Involvement of the neuropeptide substance P in lung inflammation induced by hepatic ischemia/reperfusion. *Inflammation Research*, v. 53, p. 257-261, 2004.

OKUDAIRA, M.; SCHWARZ, J.. Histoplasma capsulatum infection in rat air pouch. *Archives of Pathology*, v. 74, p. 239-243, 1962.

OLAS, K.; BUTTERWECK, H.; TESCHNER, W.; SCHWARZ, H.P.; REIPERT, B.M.. Immunomodulatory properties of human serum immunoglobulin A: Anti-inflammatory and pro-inflammatory activities in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 140, p. 478-490, 2005.

OPPENHEIM, J.J.. Cytokines: Past, present, and future. *International Journal of Hematology*, v. 74, p. 3-8, 2001.

O'RIORDAN, T.G.; WEINSTEIN, M.D.; ABRAHAM, W.M.; FORTEZA, R.. Elevated

tissue kallikrein activity in airway secretions from patients with tracheobronchitis associated with prolonged mechanical ventilation. *Lung*, v. 181, p. 237-244, 2003.

PAEGELOW, I.; TRZECZAK, S.; BOCKMANN, S.; VIETINGHOFF, G.. Migratory responses of polymorphonuclear leukocytes to kinin peptides. *Pharmacology*, v. 66, p. 153-161, 2002.

PAGE, N.M.. Hemokinins and andokinins. *Cellular Molecular Life Science*, v. 61, p. 1652-1663, 2004.

PAGE, N.M.; BELL, N.J.; GARDINER, S.M.; MANYONDA, I.T.; BRAYLEY, K.J.; STRANGE, P.G.; Lowry, P.J.. Characterization of the endokinins: Human tachykinins with cardiovascular activity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 100, p. 6245-6250, 2003.

PAPADOPOULOU, N.; KALOGEROMITROS, D.; STAURIANEAS, N.G.; TIBLALEXI, D.; THEOHARIDES, T.C.. Corticotropin-releasing hormone receptor-1 and histidine decarboxylase expression in chronic urticaria. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 125, p. 952-955, 2005.

PARKIN, J.; COHEN, B.. An overview of the immune system. *Lancet*, v. 357, p. 1777-1789, 2001.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, J.G.V.C.; PESQUERO, J.L.; SOUZA, G.E.P.; AVELLAR, M.C.W.; TEIXEIRA, M.M.; CALIXTO, J.B.. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: Role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *Journal of Immunology*, v. 172, p. 1839-1847, 2004.

PATTERSON, C.E.; LUM, H.. Update on pulmonary edema: The role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium*, v. 8, p. 75-105, 2001.

PENNEFATHER, J.N.; LECCI, A.; CANDENAS, M.I.; PATAK, E.; PINTO, F.M.; MAGGI, C.A.. Tachykinins and tachykinin receptors: A growing family. *Life Sciences*, v. 74, p. 1445-1463, 2004.

PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPENSTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA Jr, J.A.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.M.; CALIXTO, J.B.; LEWIN, G.R.; BADER, M.. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v.97, p. 8140-8145, 2000.

PETRY, R.D.; REGINATTO, F.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; KAPEZINSKI, F.; ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P.. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytotherapy. Research*, v. 15, p. 162-164, 2001.

PETTERSEN, C.A.; ADLER, K.B.. Airways inflammation and COPD: Epithelial-neutrophil interactions. *Chest*, v. 121, p. 142S-150S, 2002.

PHILLIPSON, J.D.. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, v. 56, p. 237-243, 2001.

PIERCE, A.. *Practical Guide Natural Medicines*: The first authoritative home reference for herbs and nature remedies, from the Nation's largest and most respected organization of pharmacists. New York: William Morrow and Company, 1999. p.488-491.

PIO CORRÊA, M.. *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. vol v. Rio de Janeiro, Brasil: Imprensa Nacional, 1978a. p. 108.

PIO CORRÊA, M.. *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. vol III. Rio de Janeiro, Brasil: Imprensa Nacional, 1978b. p. 238-239.

PIVARCSI, A.; HOMEY, B.. Chemokine networks in atopic dermatitis: traffic signals of disease. *Curret Allergy and Asthma Reports*, v. 5, p. 284-290, 2005.

POSADAS, I.; TERCENIO, M.C.; GUILLEN, I.; FERRANDIZ, M.L.; COLOMA, J.; PAYA, M.; ALCARAZ, M.J.. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 361, p. 98-106, 2000.

PURICELLI, L.; DELL'AICA, I.; SARTOR, L.; GARBISA, S.; CANIATO, R.. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. *Fitoterapia*, v. 74, p. 302-304, 2003.

RANGAN, G.K.; WANG, Y.; TAY, Y-C.; HARRIS, D.C.H.. Inhibition of NF $\kappa$ B activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. *American Journal of Physiology*, v. 277, p. 779-789, 1999.

RANSOM, R.W.; HARRELL, C.M.; REISS, D.R.; MURPHY, K.L.; CHANG, R.S.L.; HESS, J.F.; MILLER, P.J.; O'MALLEY, S.S.; HEY, P.J.; KUNAPULI, P.; SU, D.S.; MARKOWITZ, M.K.; WALLACE, M.A.; RAAB, C.E.; JONES, A.N.; DEAN, D.C.; PETTIBONE, D.J.; FREIDINGER, R.M.; BOCK, M.G.. Pharmacological characterization and radioligand binding properties of a high-affinity, nonpeptide, bradykinin B1 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, v. 499, p. 77-84, 2004.

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

RAO, V.S.; PAIVA, L.A.; SOUZA, M.F.; CAMPOS, A.R.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A.; TEIXEIRA, M.J.; SILVEIRA, E.R.. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages. *Planta Medica*, v. 69, p. 851-853, 2003.

RATES, S.M.K.. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

- REGOLI, D.; BARABE, J.. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews*, v. 32, p. 1-46, 1980.
- REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O.. Harmanalkaloide in Passiflorae herba? In: MEIER, B.. Passiflorae herba-pharmazeutische Qualität. *Zeitschrift für Phytotherapie*, v. 16, p. 90-99, 1995.
- ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.. *Patologia estrutural e funcional*. 6ª Ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2001. p. 766.
- ROCHA, A.C.; FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.. Assessment of TNF $\alpha$  contribution to the functional up-regulation of kinin B1 receptors in the mouse paw after treatment with LPS. *International Immunopharmacology*, v. 5, p. 1593-1600, 2005.
- RODI, D.; COUTURE, R.; ONGALI, B.; SIMONATO, M.. Targeting kinin receptors for the treatment of neurological diseases. *Current Pharmaceutical Design*, v. 11, p. 1313-1326, 2005.
- RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A.. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 292, p. 869-873, 2002.
- RODRIGUES-BASTOS, A.P.M.; NASCIMENTO, C.X.; WERNECK-BARROSO, E.; CORDEIRO, R.S.B.; HENRIQUES, M.G.M.O.; MOURA, A.C.N.. Comparison between C57Bl/6 and C57Bl/10 mycobacterial mouse pleurisy with respect to cellular migration and nitric oxide production. *Inflammopharmacology*, v. 12, p. 353-372, 2004.
- ROKAYAN, S.A.. Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme in patients treated for tuberculosis. *Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan*, v. 13, p. 11-14, 2003.
- ROMAGNANI, S.. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, v. 85, p. 9-18, 2000.
- SABAN, M.R.; SABAN, R.; HAMMOND, T.G.; HAAK-FRENDSCHO, M.; STEINBERG, H.; TENGOWSKI, M.W.; BJORLING, D.E.. LPS-sensory peptide communication in experimental cystitis. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, v. 282, p. F202-F210, 2002.
- SACCO, J.C.. Passifloráceas. In: Reitz, R. (Ed). *Flora Illustrada Catarinense*, fasc. PASS. Itajaí, 1980. p. 132.
- SAKATA, K.; HIROSE, Y.; QIAO, Z.; TANAKA, T.; MORI, H.. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Letters*, v. 199, p. 139-145, 2003.

- SALAS, A.; SANS, M.; SORIANO, A.; REVERTER, J.C.; ANDERSON, D.C.; PIQUÉ, J.M.; PANÉS, J.. Heparin attenuates TNF- $\alpha$  induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. *Gut*, v. 47, 88-96, 2000.
- SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology*, v. 118, p. 811-819, 1996.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *European Journal of Pharmacology*, v. 331, p. 43-52, 1997.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, v. 20, p. 949-956, 1999.
- SALEH, T.S.F.; VIANNA, R.M.J.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CHAKRAVARTY, B.J.M.; KYLE, D.J.; CALIXTO, J.B.. Oral-anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, v. 363, p. 179-187, 1998.
- SANTOS, D.R.; CALIXTO, J.B.; SOUZA, G.E.. Effect of a kinin B<sub>2</sub> receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rat. *British Journal of Pharmacology*, v. 139, p. 271-278, 2003.
- SANTOS, K.C.; SANTOS, C.A.M.; OLIVEIRA, R.M.W.. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 306-309, 2005.
- SARZI-PUTTINIA, P.; ATZENIA, F.; SHOENFELDB, Y.; FERRACCIOLIC, G.. TNF- $\alpha$ , rheumatoid arthritis, and heart failure: A rheumatological dilemma. *Autoimmunity Reviews*, v. 4, p. 153-161, 2005.
- SATAKE, H.; KAWADA, T.; NOMOTO, K.; MINAKATA, H.. Insight into tachykinin-related peptides, their receptors, and invertebrate tachykinins: A review. *Zoological Science*, v. 20, p. 533-549, 2003.
- SCHENKEL, E.P.. *Cuidados com os Medicamentos*. 3ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS/ Editora da UFSC/ Brasil, 1998. p. 134.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R.. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento e medicamentos In: *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; DE MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. (eds). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora UFSC/ Brasil, 2001. p. 301-330.
- SCHMAIER, A.H.. Plasma kallikrein/kinin system: A revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Current Opinion in Hematology*, v. 7, p. 261-265, 2000.

SCHRAMM, R.; LIU, Q.; THORLACIUS, H.. Expression and function of MIP-2 are reduced by dexametasone treatment in vivo. *British Journal of Pharmacology*, v. 131, p. 328-334, 2000.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A.. In: *Handbook of inflammation*. BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. (eds), New York: Elsevier, 1985. p. 27-47.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A.. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: *Textbook of immunopharmacology*. New York, 1989. p. 253-261.

SEEGERS, H.C.; HOOD, V.C.; KIDD, B.L.; CRUWYS, S.C.; WALSH, D.A.. Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 306, p. 8-12, 2003.

SEIGLER, D.S.; PAULI, G.F.; NAHRSTEDT, A.; LEEN, R.. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry*, v. 60, p. 873-882, 2002.

SHARMA, J.N.; AL-DHALMAWI, G.S.. Bradykinin receptor antagonists: Therapeutic implications. *IDrugs*, v. 6, p. 581-586, 2003.

SICKER, T.; WUCHOLD, F.; KAISER, B.; GLUSA, E.. Systemic vascular effects of thrombin and thrombin receptor activating peptide in rats. *Thrombosis Research*, v. 101, p. 467-475, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R.. *Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul*. 5ª Ed. Porto Alegre, Brasil: Editora Universidade/UFRGS, 1998.

SIN, Y.M.; POOK, S.H.; TAN, T.M.; PETTERSSON, A.; KARA, A.U.; THE, W.F.. Changes in glutathione and its associated enzymes during carrageenan-induced acute inflammation in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 116, p. 191-195, 1997.

SINGBARTL, K.; GREEN, S.A.; LEY, K.. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *FASEB Journal*, v. 14, p. 48-54, 2000.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F.. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and maltol in the mouse. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 57, p. 11-20, 1997.

SOUZA, D.G.; MENDONÇA, V.A.; CASTRO, M.S.A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M.. Role of tachykinin NK receptors on the local and remote injuries following ischaemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in the rat. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, p. 303-312, 2002.



SPECTOR, W.G.. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 72, p. 367-380, 1956.

SPENCER, K.C.; SEIGLER, D. S.. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 31, p. 794-796, 1983.

SPERONI, E.; MINGHETTI, A.. Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. *Planta Medica*, v. 54, p. 488-491, 1988.

SPIELMANN, S.; KERNER, T.; AHLERS, O.; KEH, D.; GERLACH, M.; GERLACH, H.. Early detection of increased tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and soluble TNF receptor protein plasma levels after trauma reveals associations with the clinical course. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, v. 45. p. 364-370, 2001.

SPINELLA, M.. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines (Herbal synergy review). *Alternative Medicine Review*, v. 7, 130-137, 2002.

STOWE, D.F.; HEISNER, J.S.; CHUNG, W.W.; FUJITA, S.. Volatile anaesthetics restore bradykinin and serotonin-induced coronary vasodilation after blocking nitric oxide synthase: lack of anaesthetic effects on KATP channels and prostaglandin pathways. *European Journal of Anaesthesiology*, v. 18, p. 219-230, 2001.

STRIETER, R.M.; KEANE, M.P.; BURDICK, M.D.; SAKKOUR, A.; MURRAY, L.A.; BELPERIO, J.A.. The role of CXCR2/CXCR2 ligands in acute lung injury. *Current Drug Targets Inflammation and Allergy*, v. 4, p. 299-303, 2005.

SUBAUSTE, M.C.; CHOI, D.C.; PROUD, D.. Transiente exposure of human bronchial epithelial cell to cytokines leads to persistente increased expression of ICAM-1. *Inflammation*, v. 25: 373-380, 2001.

SULLIVAN, G.W.. Adenosine A2A receptor agonist as anti-inflammatory agents. *Curret Opinion in Investigational Drugs*, v.4, p. 1313-1319, 2003.

SULLIVAN, G.W.; LEE, D.D.; ROSS, W.G.; DiVIETRO, J.A.; LAPPAS, C.M.; LAWRENCE, M.B.; LINDEN, J.. Activation of A2A adenosine receptors inhibits expression of alpha 4/beta 1 integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 75, p. 127-134, 2004.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J.. Inflammation and angiotensin II. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 35, p. 881-900, 2003.

SZABÓ, C.. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters*, v. 140, p. 105-112, 2003.

TAKAHASHI, T.; KONISHI, S.; POWELL, D.; LEEMAN, S.E.; OTSUKA, M.. Identification of the motoneuron-depolarizing peptide in bovine dorsal root as hypothalamic substance P. *Brain Research*, v. 73, p. 59-69, 1974.

- TAKAHASHI, K.; TAKEYA, M.; SAKASHITA, N.. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Medical Electron Microscopy*, v. 35, p. 179-203, 2002.
- TAKANO-ISHIKAWA, Y., GOTO, M., YAMAKI, K.. Inhibitory effects of several flavonoids on E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 1224-1227, 2003.
- TAKESHITA, K.; SAKAI, K.; BACON, K.B.; GANTNER, F.. Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 307, p. 1072-1078, 2003.
- TAKHTAJAN, A.. *Diversity and Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University, 1997. p. 643.
- TAYLOR-CLARK, T.; FOREMAN, J.. Histamine-mediated mechanisms in the human nasal airway. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 5, p. 214-220, 2005.
- THURMOND, R.L.; DESAI, P.J.; DUNFORD, P.J.; FUNG-LEUNG, W-P.; HOFSTRA, C.L.; JIANG, W.; NGUYEN, S.; RILEY, J.P.; SUN, S.; WILLIAMS, K.N.; EDWARDS, J.P.; KARLSSON, L.. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 309, p. 404-413, 2004.
- TORRE-AMIONE, G.. Immune activation in chronic heart failure. *American Journal of Cardiology*, v. 95, p. 3C-8C, 2005.
- TURUTIN, D.V.; KUBAREVA, E.A.; PUSHKAREVA, M.A.; ULLRICH, V.; SUD'INA, G.F.. Activation of NF- $\kappa$ B transcription factor in human neutrophils by sulphatides and L-selectin cross-linking. *FEBS Letters*, v. 536, p. 241-245, 2003.
- TYSON, J.J.; CHEN, K.; NOVAK, B.. Network dynamics and cell physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 908-916, 2001.
- UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M.. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity an inhibition of systemic tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 68, p. 119-125, 2004.
- VALE, N.B.; LEITE, J.R.. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). *Ciência e Cultura*, v. 35, p. 11-24, 1983.
- VAN DIEN, M.; TAKAHASHI, K.; MU, M.M.; KOIDE, N.; SUGIYAMA, T.; MORI, I.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T.. Protective effect of wogonin on endotoxin-induced lethal shock in D-galactosamine-sensitized mice. *Microbiology and Immunology*, v. 45, p. 751-756, 2001.
- VANNONI, D.; BERNIN, A.; CARLUCCI, F.; CIVITELLI, S.; DI PIETRO, M.C.; LEONCINI, R.; ROSI, F.; TABUCCHI, A.; TANZINI, G.; MARINELLO, E.. Enzyme

activities controlling adenosine levels in normal and neoplastic tissues. *Medical Oncology*, v. 21, p. 187-195, 2004.

VARGA, C.; HORVATH, K.; BERKO, A.; THURMOND, R.L.; DUNFORD, P.J.; WHITTLE, B.J.R.. Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat. *European Journal of Pharmacology*, v. 522, p. 130-138, 2005.

VARGAS JR., A.. *Avaliação da atividade antiinflamatória dos extratos aquosos de Passiflora alata Dryander e Passiflora edulis Sims, no modelo da pleurisia induzida por carragenina, em camundongos*. 2004. 127 f. Dissertação (Mestre em Farmácia) - Programa de pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VON EULER, U.S.; GADDUM, J.H.. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *Journal of Physiology*, v. 72, p. 74-86, 1931.

VOOG, U.; ALSTERGREN, P.; LEIBUR, E.; KALLIKORM, R.; KOPP, S.. Immediate effects of the serotonin antagonist granisetron on temporomandibular joint pain in patients with systemic inflammatory disorders. *Life Science*, v. 68, p. 591-602, 2000.

WADSWORTH, T.L.; MCDONALD, T.L.; KOOP, D.R.. Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochemical Pharmacology*, v. 62, p. 963-974, 2001.

WAKAI, A.; WANG, J.H.; WINTER, D.C.; STREET, J.T.; O'SULLIVAN, R.G.; REDMOND, H.P.. Adenosine inhibits neutrophil vascular endothelial growth factor release and transendothelial migration via A<sub>2B</sub> receptor activation. *Shock*, v. 15, p. 297-301, 2001.

WILLIAMSON E.M.. Synergy – myth or reality? In: Ernst, E. (ed). *Herbal medicine a concise overview for professionals*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2000. p. 48-58.

WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.M.; KETLE, A.J.. Myeloperoxidase. *Current Opinion in Hematology*, v. 7, p. 53-58, 2000.

WINTERHALTER, P.J.. Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 452-455, 1990.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.; DAJAS, F.; MEDINA, J. H.. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 47, p. 1-4, 1994.

WOLFRUM, S.; RICHARDT, G.; DOMINIAK, P.; KATUS, H.A.; DENDORFER, A.. Apstatin, a selective inhibitor of aminopeptidase P, reduces myocardial infarct size by a kinin-dependent pathway. *British Journal of Pharmacology*, v. 134, p. 370-374, 2001.

- WONG, M.M.; FISH, E.M.. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. *Seminars in Immunology*, v. 15, p. 5-14, 2003.
- WOTHERSPOON, F.; BROWNE, D.L.; MEEKING, D.R.; ALLARD, S.E.; MUNDAY, L.J.; SHAM, K.M.; CUMMINGS, M.H.. The contribution of nitric oxide and vasodilatory prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in type 1 diabetes. *Diabetic Medicine*, v. 22, p. 697-702, 2005.
- YAMASHIRO, K.; KIRYU, J.; TSUJIKAWA, A.; NONAKA, A.; HONJO, M.; TANIHARA, H.; NISHIWAKI, H.; HONDA, Y.; OGURA, Y.. Suppressive effects of histamine H1 receptor antagonist diphenhydramine on the leukocyte infiltration during endotoxin-induced uveitis. *Experimental Eye Research*, v. 73, p. 69-80, 2001.
- YONEYAMA, Y.; SAWA, R.; SUZUKI, S.; OTSUBO, Y.; MIURA, A.; KUWABARA, Y.; ISHINO, H.; KIYOKAWA, Y.; DOI, D.; YONEYAMA, K.; KOBAYASHI, H.; ARAKI, T.. Serum adenosine-deaminase activity in women with pre-eclampsia. *Gynecology and Obstetric Investigation*, v. 54, p. 164-167, 2002.
- YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S.. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1229-1234, 2000.
- YOUSIF, M.H.M.. Histamine-induced vasodilation in the perfused kidney of STZ-diabetic rats: Role of EDNO and EDHF. *Pharmacological Research*, v. 51 p. 515-521, 2005.
- ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M.. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia*, v. 71, p. S117-S123, 2000.
- ZERWES, H.G.; PETER, J.C.; LINK, M.; GUBLER, H.; SCHEEL, G.. A multiparameter screening assay to assess the cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Analytical Biochemistry*, v. 304, p. 166-173, 2002.
- ZHANG, W.J.; FREI, B..  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *FASEB Journal*, v. 15, p. 2423-2432, 2001.
- ZHANG, Y.; ADNER, M.; CARDELL, L.O.. Up-regulation of bradykinin receptors in a murine in-vitro model of chronic airway inflammation. *European Journal of Pharmacology*, v. 489, p. 117-126, 2004.
- ZHANG, Y.; ADNER, M.; CARDELL, L.O.. Glucocorticoids suppress transcriptional up-regulation of bradykinin receptors in a murine in vitro model of chronic airway inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 35, p. 531-538, 2005.
- ZHANG, Y.; LU, L.; FURLONGER, C.; WU G.E.; PAIGE, C.J.. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nature Immunology*, v. 1, p. 392-397, 2000.

ZHANG, X.W.; WANG, Y.; LIU, Q.; THORLACIUS, H.. Redundant function of macrophage inflammatory protein-2 and KC in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced extravasation of neutrophils in vivo. *European Journal of Pharmacology*, v. 427, p. 277-283, 2001.

ZHAO, J.; SHARMA, Y.; AGARWAL, R.. Significant inhibition by the flavonoid antioxidant silymarin against 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate-caused modulation of antioxidant and inflammatory enzymes, and cyclooxygenase 2 and interleukin-1 $\alpha$  expression in SENCAR mouse epidermis: Implications in the prevention of stage I tumor promotion. *Molecular Carcinogenesis*, v. 26, p. 321-333, 1999.

ZIMMERMANN, M.. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, p. 109-110, 1983.

ZINGARELLI, B.; SHEEHAN, M.; WONG, H.R.. Nuclear factor- $\kappa$ B as a therapeutic target in critical care medicine. *Critical Care Medicine*, v. 31, p. 105-111, 2003.

ZOHAR, Y.; WILDBAUM, G.; KARIN, N.. Beneficial autoimmunity participates in the regulation of rheumatoid arthritis. *Frontiers Bioscience*, v. 11, p. 368-379, 2006.

ZUCOLOTTO, S.M.. *Estudo fitoquímico das folhas, frutos e raízes de Passiflora edulis forma flavicarpa Degener*. 2005. 129 f. Dissertação (Mestre em Farmácia) - Programa de pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ANEXO