

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIPIRÉTICA E ANTIINFLAMATÓRIA DO
EXTRATO BRUTO E DO ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO ISOLADO DE
Cladonia verticillaris (LÍQUEN)**

MAURÍCIO SANTOS DE OLIVEIRA

RECIFE – 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIPIRÉTICA E ANTIINFLAMATÓRIA DO
EXTRATO BRUTO E DO ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO ISOLADO DE
Cladonia verticillaris (LÍQUEN)**

Maurício Santos de Oliveira

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre.**

Orientador: Prof^a. Dr^a Maria Bernadete de Sousa Maia

Co-orientadores: Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva

Prof^a. Dr^a. Eugênia Cristina Pereira

RECIFE

2003

FOLHA DE APROVAÇÃO

Banca examinadora:

- 1º Examinador: Profº Dr. Vietla S. Rao
- 2º Examinador: Profª Drª Laise de Holanda Cavalcanti
- 3º Examinador: Profª Drª Carmem de Castro Chaves (Presidente)

DEDICATÓRIA

A Deus que me presenteou com a vida.
À minha família pelo apoio e dedicação em
todos os planos que tracei.
Ao amor que alimenta tudo.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Professora Maria Bernadete de Sousa Maia pela imprescindível orientação científica, paciência e amizade.

À Professora Eugênia Cristina Pereira e ao Professor Nicácio Henrique da Silva pela valorosa competência e apoio na co-orientação deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da UFPE pela dedicação, incentivo e conhecimentos dispensados durante o curso.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia da UFPE pelo apoio e disponibilidade oferecidos na realização deste trabalho.

Ao amigo João Esmeraldo pelo companheirismo e incentivo durante toda essa jornada.

Aos colegas do curso de mestrado pelo carinho, estímulo e amizade.

A todos que direta ou indiretamente me auxiliaram na superação deste desafio.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Hábitos básicos dos líquens.....	14
FIGURA 2 – Modelo esquemático da microestrutura do talo liquênico.....	15
FIGURA 3 – Marginação leucocitária em vênula.....	18
FIGURA 4 – Inter-relação entre cininas, complemento e coagulação.....	22
FIGURA 5 - Geração de metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação.....	25
FIGURA 6 – <i>Cladonia verticillaris</i> . Vista do tufo liquênico (A) e do talo particularizado (B).....	39
FIGURA 7 – Edema de pata induzido por carragenina	44
FIGURA 8 – CCD do extrato acetônico obtido de <i>Cladonia verticillaris</i>	48
FIGURA 9 – CLAE do extrato acetônico de <i>Cladonia verticillaris</i>	49
FIGURA 10 – Efeito do extrato acetônico e da indometacina no edema agudo de pata induzido pela injeção subplantar de carragenina.....	51
FIGURA 11 – Efeito do extrato acetônico e do maleato de dexclorfeniramina no edema agudo de pata induzido pela injeção subplantar de dextran.....	52
FIGURA 12 - Efeito do ácido fumarprotocetrárico no edema agudo de pata induzido pela injeção subplantar de zimosan.....	53
FIGURA 13 – Inter-relação entre óxido nítrico, prostaglandinas e radicais livres derivados de oxigênio no edema de pata induzido por carragenina.....	60
FIGURA 14 – Mecanismos que permitem o acúmulo de macrófagos no sítio de inflamação crônica.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Concentração de substâncias no extrato acetônico obtido de <i>Cladonia verticillaris</i>	49
TABELA 2 – Efeito do extrato acetônico de <i>Cladonia verticillaris</i> , do ácido fumarprotocetrárico e da fenilbutazona nas contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	50
TABELA 3 - Comparação dos pesos dos granulomas dos grupos tratados com extrato acetônico de <i>Cladonia verticillaris</i> e indometacina.....	54
TABELA 4 - Efeito do extrato acetônico de <i>Cladonia verticillaris</i> e da indometacina na artrite induzida por formaldeído.....	55
TABELA 5 – Efeito do extrato acetônico de <i>Cladonia verticillaris</i> , do ácido fumarprotocetrárico e do paracetamol na febre induzida por lipopolissacarídeo em ratos.....	56

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- 5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)
- AINEs - Antiinflamatórios não-esteroidais
- ATR – Atranorina
- AVP – Arginina-vasopressina
- CAM – Complexo de ataque à membrana
- cNOS – Óxido nítrico sintase constitutiva
- COX-1 – Ciclooxigenase-1
- COX-2 – Ciclooxigenase-2
- CR3 – Receptor leucocitário para o complemento
- DL50 - Dose letal para 50% dos animais em experimentação
- eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
- FUM – Ácido fumarprotocetrárico
- HETEs – ácidos hidroxieicosatetraenoicos
- i.p. - Intraperitoneal
- IG_E – Imunoglobulina E
- IL-1 – Interleucina-1
- IL-6 – Interleucina-6
- IL-8 – Interleucina-8
- iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
- kD – Kilodalton
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTB₄ – Leucotrieno B₄
- L-NIL – N-iminoetil-L-lisina
- n NOS – Óxido nítrico sintase neuronal
- NO – Óxido nítrico
- NOS – Óxido nítrico sintase
- PAF – fator de ativação plaquetária
- PC – Proteína C
- PGE₁ – Prostaglandina E₁

- PGE_2 – Prostaglandina E_2
- PGEs - Prostaglandina da série E
- PGH_2 – Prostaglandina H_2
- PGI_2 – Prostaciclina
- PM – Peso molecular
- PMN – Polimorfonuclear
- PRO – Ácido protocetrário
- PS – Proteína S
- Rf – Relação a frente
- RNAm – RNA (ácido ribonucléico) mensageiro
- SNC – Sistema nervoso central
- TR – Tempo de Retenção
- $\text{TNF-}\alpha$ – Fator de necrose tumoral α
- TXA_2 – Tromboxano A_2
- v.o. – Via oral
- α -MSH – Hormônio melanotrófico
- nm – Nanômetros

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Considerações Gerais sobre Líquens.....	14
1.1.1 Substâncias liquênicas.....	16
1.2 O Processo Inflamatório.....	17
1.2.1 Mediadores químicos da resposta inflamatória.....	19
<u>Histamina</u>	19
<u>Serotonina</u>	20
<u>Cininas hipotensoras</u>	21
<u>Sistema complemento</u>	22
<u>Sistema da coagulação</u>	23
<u>Metabólitos do ácido araquidônico</u>	24
<u>Mecanismo de ação antiinflamatória dos AINEs</u>	26
<u>Fator de ativação plaquetário</u>	29
<u>Citocinas e quimiocinas</u>	29
<u>Óxido nítrico</u>	31
<u>Constituintes lisossômicos dos leucócitos</u>	32
<u>Radicais livres derivados de oxigênio</u>	32
<u>Neuropeptídeos</u>	34
1.3 Mecanismo de Ação Analgésica dos AINEs.....	34
1.4 Mecanismo de Ação Antipirética dos AINEs.....	35
2 RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	37
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Geral.....	38
3.2 Específicos.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Coleta e Identificação do Líquen.....	39
4.2 Preparação do Extrato Acetônico.....	40
4.3 Isolamento e Purificação do Ácido Fumarprotocetrárico.....	40
4.4 Cromatografia em Camada Delgada.....	40
4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	41

4.6 Ensaio Farmacológicos.....	41
4.6.1 Animais experimentais.....	41
4.6.2 Soluções e drogas utilizadas.....	41
4.6.3 Determinação da toxicidade aguda.....	42
4.6.4 Atividade antinociceptiva.....	42
4.6.4.1 Teste de writhing.....	42
4.6.5 Inflamação aguda.....	43
4.6.5.1 Edema de pata induzido por carragenina.....	43
4.6.5.2 Edema de pata induzido por dextrana.....	44
4.6.5.3 Edema de pata induzido por zimosan.....	45
4.6.6 Inflamação subcrônica – lesão granulomatosa induzida por “pellets” de algodão.....	45
4.6.7 Inflamação crônica – artrite induzida por formaldeído.....	45
4.6.8 Outros testes relevantes para drogas antiinflamatórias.....	46
4.6.8.1 Teste da placa quente.....	46
4.6.8.2 Atividade antipirética em ratos.....	46
4.7 Testes Estatísticos.....	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Identificação e quantificação dos compostos do extrato acetônico.....	48
5.2 Toxicidade aguda.....	50
5.3 Teste de “Writhing”.....	50
5.4 Edema de Pata Induzido por Carragenina.....	51
5.5 Edema de pata induzido por dextrana.....	51
5.6 Edema de pata induzido por zimosan.....	52
5.7 Inflamação Subcrônica – lesão granulomatosa por induzida por “pellets” de algodão.....	53
5.8 Inflamação Crônica – artrite induzida por formaldeído.....	54
5.9 Potencial ulcerogênico do extrato acetônico.....	55
5.10 Teste da Placa Quente.....	55
5.11 Atividade Antipirética em Ratos.....	56
6 DISCUSSÃO.....	57
7 CONCLUSÕES.....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

RESUMO

O propósito deste trabalho foi avaliar a atividade antiinflamatória, antinociceptiva e antipirética do extrato acetônico e do ácido fumarprotocetrárico isolado de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., ocorrente sobre solos arenosos de tabuleiros do município de Mamanguape (PB-Brasil). O extrato acetônico foi obtido a partir do talo liquênico seco e sua composição foi analisada através de cromatografia em camada delgada, que mostrou a presença dos ácidos fumarprotocetrárico e protocetrárico, além da atranorina e outros compostos não identificados. O ácido fumarprotocetrárico foi isolado, purificado e testado frente a diferentes modelos experimentais de inflamação, nocicepção e piroxia. Os resultados demonstraram atividade antiinflamatória significativa ($p < 0,05$) para o extrato acetônico (200mg/kg; v.o.) nos testes de inflamação aguda induzida por carragenina aos 30 (20,18%) e 180 (28,85%) minutos, por dextrana aos 60 (38,27%), 120 (42,12%) e 180 (50,95%) minutos e na inflamação crônica induzida por formaldeído do 2º ao 10º dia (32,68%, 48,10%, 66,55%, 68,96%, 66,53%, 69,25%, 62,89%, 61,12% e 56,23%, respectivamente). Para os testes de atividade antinociceptiva, o extrato (100 ou 200 mg/kg; v.o.) mostrou efeito antinociceptivo periférico significativo ($p < 0,05$), inibindo o número de contorções abdominais (42,14% ou 58,57%, respectivamente). Na febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS), o extrato acetônico (200 mg/kg; v.o.) demonstrou atividade antipirética significativa ($p < 0,05$) aos 30 (72,82%) e 60 (53,58%) minutos. O extrato acetônico não demonstrou atividade nos seguintes ensaios: lesão granulomatosa induzida por “pellets” de algodão e teste da placa quente. O extrato apresentou baixa toxicidade, não havendo registro de morte até a dose oral de 2g/Kg. Além dessa baixa toxicidade, a avaliação macroscópica da mucosa gástrica dos animais submetidos a tratamento agudo, subcrônico e crônico com o extrato não revelou indício de lesão gástrica. O ácido fumarprotocetrárico isolado (25 ou 50 mg/kg; i.p.) apresentou ação anti-edematogênica significativa ($p < 0,01$) no edema de pata induzido por zimosan aos 60 (48,23% ou 55,57%), 120 (46,84% ou 56,24%), 180 (49,94% ou 60,61%) e 240 (47,77% ou 60,45%) minutos, respectivamente. Para os testes de atividade antinociceptiva, o ácido fumarprotocetrárico (400 mg/kg; v.o.) mostrou efeito antinociceptivo periférico significativo ($p < 0,01$), inibindo o número de contorções abdominais (60%). Na febre induzida por lipopolissacarídeo, o ácido fumarprotocetrárico isolado (25 ou 50 mg/kg; i.p.) demonstrou atividade antipirética significativa ($p < 0,05$) aos 30 (44,44% ou 72,22%) e 60 (39,02% ou 56,09%) minutos, respectivamente. Os resultados sugerem que o extrato acetônico obtido de *C. verticillaris* possui considerável ação antiinflamatória, antinociceptiva e antipirética; e o seu principal composto, o ácido fumarprotocetrárico, pode ser sugerido como possível princípio ativo responsável por estas atividades.

Palavras-chave: Atividade antinociceptiva, Atividade antiinflamatória, Atividade antipirética, Líquens, Ácido fumarprotocetrárico, *Cladonia verticillaris*.

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activity of the acetonc extract and the isolated fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. occurring on sandy soils of savannah-like vegetation of Mamanguape county (Paraíba-Brazil). The acetonc extract was obtained from the dried lichen thallus and its composition was analyzed by thin layer chromatography (TLC) that showed the presence of the fumarprotocetraric acid, protocetraric acid, atranorin and other non-identified compounds. The fumarprotocetraric acid was isolated, purified and tested at several experimental models of inflammation, nociception and pyrexia. The results demonstrated significant ($p<0,05$) anti-inflammatory activity for the acetonc extract (200 mg/kg; p.o.) on acute inflammation induced by carrageenan at 30 (20,18%) and 180 (28,85%) minutes or dextran at 60 (38,27%), 120 (42,12%) and 180 (50,95%) minutes and on the chronic inflammation induced by formaldehyde from day 2 to day 10 (32,68%, 48,10%, 66,55%, 68,96%, 66,53%, 69,25%, 62,89%, 61,12% and 56,23%, respectively). To the antinociceptive tests, the extract (100 or 200 mg/kg; p.o.) showed significant ($p<0,05$) peripheral analgesic effect inhibiting the number of abdominal contortions (42,14% or 58,57%, respectively). The extract (200 mg/kg; p.o.) demonstrated significant ($p<0,05$) antipyretic activity on the fever induced by lipopolysaccharide at 30 (72,82%) and 60 (53,58%) minutes, respectively. The acetonc extract didn't show activity on the cotton pellet – induced granuloma and hot-plate test. The extract presented low toxicity, with no death until oral administration of the compound at 2g/kg; p.o. On the gastric toxicity test, the examined stomachs didn't show lesions. The purified fumarprotocetraric acid (25 or 50 mg/kg; i.p.) presented significant ($p<0,01$) anti-edematogenic action on zymosan-induced paw edema at 60 (48,23% or 55,57%), 120 (46,84% or 56,24%), 180 (49,94% or 60,61%) and 240 (47,77% or 60,45%) minutes, respectively. To the antinociceptive tests, the fumarprotocetraric acid (400 mg/kg; p.o.) showed significant ($p<0,01$) peripheral analgesic effect inhibiting the number of abdominal contortions (60%). On fever induced by lipopolysaccharide (LPS), the fumarprotocetraric acid (25 or 50 mg/kg; i.p.) demonstrated significant ($p<0,05$) antipyretic activity at 30 (44,44% or 72,22%) and 60 (39,02% or 56,09%) minutes, respectively. The results suggest the acetonc extract obtained from *C. verticillaris* possess notable anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activity and its major compound, the fumarprotocetraric acid, may be suggested to be the active principle responsible for those activities.

Key words: Antinociceptive activity, Anti-inflammatory activity, Antipyretic activity, Lichens, Fumarprotocetraric acid, *Cladonia verticillaris*.

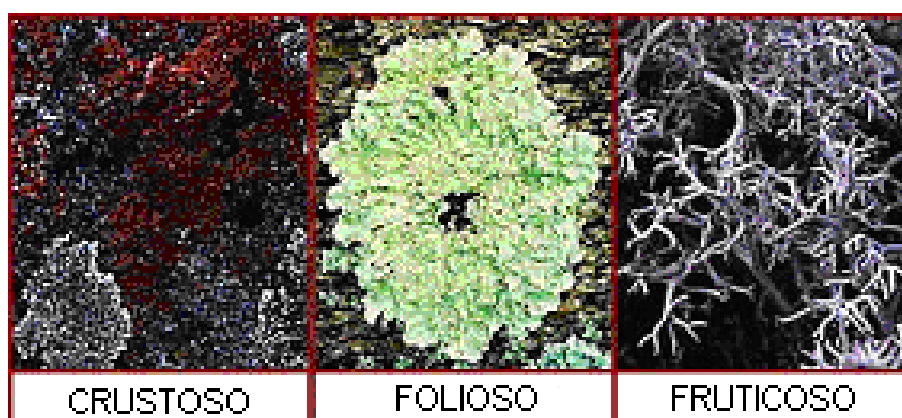
1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais sobre Líquens:

Os líquens não são organismos individuais como a maioria dos outros seres vivos e sim a associação entre dois simbiontes que vivem e interagem intimamente (COCCHIETTO et al., 2002). A maior parte do líquen é composta de filamentos de fungos (hifas) mas entre os filamentos vivem células de algas, geralmente representantes de clofíceas (verdes) e cianobactérias (azuis). (ALEXOPOULOS et al., 1979). A alga e o fungo associam-se simbioticamente, mas podem também ocorrer na natureza sem seu parceiro. A associação entre a alga e o fungo propicia a transferência de nutrientes entre os organismos, mantendo o equilíbrio de carbono, hidrogênio e outros elementos vitais (SEAWARD, 1988).

De acordo com SPEER (2002), os líquens podem ocorrer em três distintos hábitos (Figura 1):

- Crustoso (forma de crosta aderida contra o substrato).
- Folioso (forma de folha sobre o substrato).
- Fruticoso (apresenta-se em forma de arbusto).

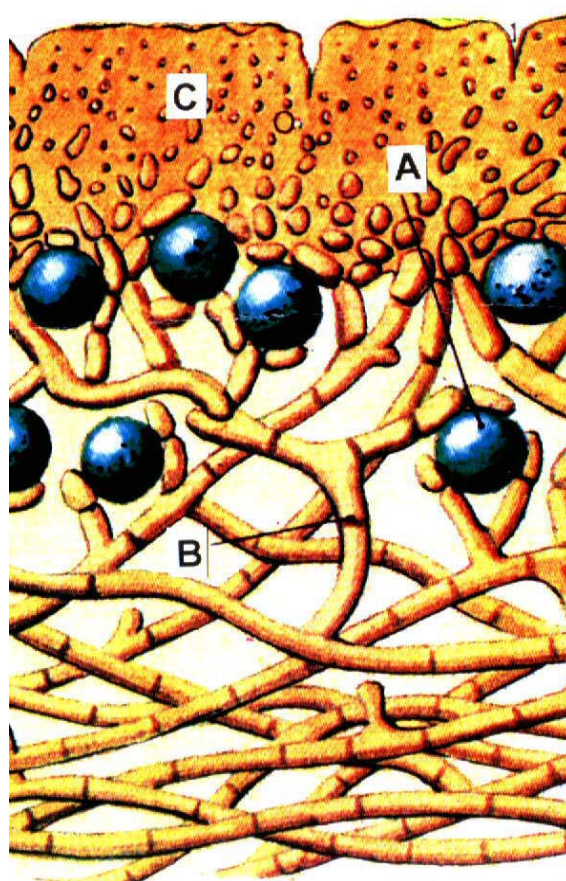


Fonte: SPEER (2002)

FIGURA 1 – Hábitos básicos dos líquens.

Apesar da diversidade de hábitos de crescimento, todos os líquens têm uma morfologia interna similar. As partes componentes do líquen estão dispostas no talo. O talo líquênico é formado principalmente por hifas do fungo e a densidade relativa

desses filamentos define as camadas do líquen (XAVIER – FILHO & RIZZINI, 1976). Na superfície externa ou córtex, os filamentos estão agrupados firmemente para proteger o líquen de outros organismos e reduzir a intensidade da luz que poderia causar dano às células das algas (LEGAZ et al., 1986). As algas estão dispostas logo abaixo do córtex em uma camada onde as hifas não estão tão densas. Abaixo da camada de algas encontra-se a medula, que corresponde a um feixe de hifas frouxas. Nos líquens foliosos há um segundo córtex abaixo da medula (córtex inferior) mas nos líquens crustosos a medula está em contato direto com o substrato ao qual o líquen está aderido. A Figura 2 mostra um exemplo de líquen crustoso.



Fonte: PEREIRA (2000)

FIGURA 2 – Modelo esquemático da microestrutura do talo liquênico. (A) Fotobionte, ou camada gonidial; (B) Hifas medulares ou medula; (C) Hifas corticais ou córtex superior.

1.1.1 Substâncias liquênicas

Os líquens produzem metabólitos secundários denominados “substâncias liquênicas”, antigamente chamadas de ácidos liquênicos. A maioria dessas substâncias é de natureza fenólica e são elas as responsáveis por grande parte das atividades biológicas atribuídas aos líquens (HALE, 1983).

O metabolismo secundário dos líquens produz compostos que são agrupados em quatro famílias químicas bioenergeticamente relacionadas: depsídeos, depsinonas, dibenzofuranos e ácidos úsnicos (VICENTE, 1975).

As substâncias liquênicas têm demonstrado muitas propriedades farmacológicas: analgésica e antiinflamatória (SULEYMAN et al., 2002; MAIA et al., 2002), antipirética (MULLER, 2001), antiproliferativa e citotóxica (KUMAR et al., 1999), antitumoral (OLAFSDOTTIR et al., 2001), antiviral (CAMPANELLA et al., 2002), antibiótica (LAUTERWEIN et al., 1995; INGOLFSDOTTIR et al., 1998), dentre outras. Essas descobertas têm estimulado várias especulações sobre o potencial dessas substâncias como fonte de novos fármacos.

No talo de *Cladonia verticillaris* já foi detectada a presença de vários compostos, entre eles o orcinol, β -metil orcinol, carboxilato, atranorina, ácido evérnico, ácido protocetrárico e ácido fumarprotocetrárico (XAVIER-FILHO et al., 1984; PEREIRA, 1989), além dos produtos intermediários da biossíntese deste último, como o ácido hipoprotocetrárico e seu aldeído (AHTI et al., 1993; PEREIRA et al., 1999).

A busca por produtos naturais pode gerar uma diversidade estrutural maior do que a química sintética convencional e oferece oportunidades significantes para a descoberta de novos compostos com baixo peso molecular (BINDSEIL, 2001). Atualmente cresce o interesse da sociedade pela utilização de fitoterápicos para o tratamento de uma grande diversidade de enfermidades, devido também ao baixo custo desses produtos. Por outro lado, deve-se ressaltar que o Nordeste brasileiro é caracterizado por sua enorme variedade de produtos naturais com propriedades medicinais. A tecnologia hoje disponível para a transformação desses produtos em valor econômico, torna o mapeamento de plantas medicinais, e seu estudo científico, fonte de riqueza em potencial para a região. O estudo dessa biodiversidade regional é importante para o estímulo a políticas de preservação da

variedade de vidas e o reconhecimento da necessidade de explorar, sem, contudo, degradar o ambiente.

A busca de novos compostos obtidos de produtos naturais, com efetiva atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética tem sido de alta relevância para a terapêutica da inflamação.

1.2 O Processo Inflamatório

A inflamação, apesar de ser um fenômeno complexo, caracteriza-se fundamentalmente por manifestar-se de maneira estereotipada. Independente da natureza do estímulo (químico, biológico ou mecânico), observa-se, inicialmente, dilatação e ingurgitamento dos vasos da área afetada, principalmente capilares e arteríolas, com aumento do fluxo sanguíneo em todo o leito vascular. Numa etapa seguinte, ocorre extravasamento de plasma do interior dos vasos, principalmente vênulas, para o tecido intersticial adjacente. O aumento relativo da concentração de eritrócitos devido ao extravasamento de plasma determina a estase de fluxo sanguíneo, que facilita a marginação leucocitária. Os leucócitos penetram nos tecidos através da passagem pelas paredes dos vasos sanguíneos, após a ligação por intermédio de moléculas de adesão aos respectivos receptores no endotélio e subsequente processo de transmigração pelo endotélio (IMHOF et al., 1995) (Figura 3).

A migração leucocitária para dentro dos tecidos é essencial para a defesa contra patógenos e antígenos estranhos ao organismo. No entanto, este mesmo fenômeno pode produzir inflamação inapropriada e destruição tecidual em vários tipos de doenças inflamatórias crônicas, agudas e auto-imunes (JAAKKOLA et al., 2000).



Fonte: Faculdade de Odontologia Universidade de São Paulo

FIGURA 3 – Marginação leucocitária em vênula. Os neutrófilos aproximam-se do endotélio (setas), praticamente aderindo-se a essa célula. Fora do vaso já se notam alguns leucócitos que já concluíram a leucodiapedese. Em algumas situações, os leucócitos do tipo macrófagos podem unir-se e formar as chamadas células gigantes (G).

Os monócitos deixam a corrente sanguínea constantemente para repor a população de macrófagos teciduais, mas o seu extravasamento ocorre em escala muito maior quando se tratam de sítios de inflamação. Os granulócitos, em contraste, somente deixam o sangue quando há um foco de inflamação presente (SALMI, et al., 1997).

Após o extravasamento dos leucócitos, estes migram em direção ao local da lesão por um processo chamado de quimiotaxia. Diversas substâncias endógenas e exógenas podem atuar como quimiotáticos. Os agentes quimiotáticos exógenos são geralmente produtos bacterianos. Dentre as substâncias endógenas que podem atuar como quimiotáticos podem ser citados: componentes do sistema complemento - C5a (KILGORE et al., 1994), fator de ativação plaquetária – PAF (KIM et al., 1995), vários produtos da lipoxigenase – leucotrieno B₄ (LTB₄) ou ácidos hidroieicosatetraenóicos (HETEs) (FREED et al., 1999) e alguns produtos da ciclooxigenase como as prostaglandinas (ISSEKUTZ et al., 1982).

Com o acúmulo de leucócitos no foco inflamatório, ocorre o fenômeno da fagocitose e liberação de metabólitos tóxicos e proteases no meio extracelular (COLLINS, 2000).

Com as substâncias liberadas pela fagocitose, normalmente o processo regride e resolve-se sem seqüelas. No entanto, como muitos produtos liberados pelos neutrófilos são potencialmente nocivos, eles podem ser a causa de várias enfermidades tanto de caráter agudo como crônico (MOXLEY et al., 1997).

A ativação leucocitária, liberação de radicais livres, proteases, metabólitos do ácido araquidônico, citocinas inflamatórias e antiinflamatórias liberadas no local inflamado podem induzir a secreção de quimiocinas e substâncias imunomoduladoras pelas células endoteliais, epiteliais e células intersticiais, criando uma resposta inflamatória local exacerbada (RINALDO et al., 1990; AGOURIDAKIS et al., 2002). Os eventos seguintes dessas interações humorais/celulares são importantes para a iniciação e propagação da resposta inflamatória responsável por injúrias teciduais (STRIETER et al., 1994). Por fim, o órgão afetado pode sofrer lesão funcional grave. A terapêutica antiinflamatória nestes casos é essencial.

1.2.1. Mediadores químicos da resposta inflamatória

Histamina

A histamina forma-se no organismo por ação da histidinadescarboxilase e está localizada, na sua maior parte, em formações granulares dos mastócitos (GRAFF et al., 2002).

A histamina é uma molécula pequena e rapidamente difusível com uma ação temporária nas células-alvo. Ela une-se ionicamente à matriz granular da qual é prontamente liberada na secreção, sendo capaz de induzir o aumento da permeabilidade vascular na microcirculação e contração das células endoteliais, assim como um relaxamento do músculo liso vascular e contração de outros músculos lisos. O aumento da permeabilidade vascular causado pela histamina ocorre essencialmente nas vênulas pós-capilares (LAGUNOFF, 1966; MAJNO et al., 1969).

A histamina pode ser liberada de suas reservas, nas formações granulares dos mastócitos, através de estímulos vários como processos líticos, citotóxicos (agentes físicos) ou por exocitose granular sem lesão do mastócito

(reações imunes, neuropeptídeos, citocinas, toxinas, componentes do sistema complemento (MEUER et al., 1981; HOLGATE, 1995; WASSERMAN, 1989)).

A histamina é considerada o principal mediador na fase imediata de aumento de permeabilidade vascular e exerce seus efeitos pela ocupação principalmente de receptores H1 localizados nas células endoteliais (COLLINS, 2000).

A histamina também induz aumentos localizados de extravasamento de plasma e adesão de leucócitos através de mudanças no endotélio (THORLACIUS et al., 1995).

Os anti-histamínicos anti-H1 pertencem à classe da etilenodiamina (ex.: pirilamina), à classe da etanolamina (ex.: difenidramina), à classe das alquilaminas (ex.: clorfeniramina) ou podem ser derivados de piperazina (ex.: clorciclizina), ou da fenotiazina (ex.: prometazina) (LEME et al., 1998).

Serotonina

A serotonina é uma amina vasoativa que possui ações semelhantes à histamina e foi originalmente isolada do sistema das células enterocromafins na mucosa gastrointestinal, mas também está presente no sistema nervoso central e nas plaquetas (ERSPAMER et al., 1952; BARMAN, 1997).

Usando microscopia de luz e marcação com carbono, MAJNO et al. (1961) demonstraram que o aumento de permeabilidade induzido pela serotonina estava confinado às vênulas e não envolvia os verdadeiros capilares. Subseqüentemente, microscopia eletrônica feita por MAJNO & PALADE (1961) revelou que o extravasamento das vênulas estava associado ao desenvolvimento de aberturas ou “gaps” no endotélio venular.

MICHEL & KENDALL (1997) demonstraram que os efeitos da serotonina e histamina eram temporários, com picos de aumento na permeabilidade dentro de 3 minutos após microperfusão com a serotonina, e entre 6 e 9 minutos com a histamina. A permeabilidade retornou aos níveis normais entre 12 e 30 minutos, a despeito da presença do mediador no perfusato. Portanto, a mudança de permeabilidade durante o tempo corresponde aproximadamente com a abertura e fechamento dos “gaps” no endotélio venular. Estes mesmos autores relataram ainda efeitos quantitativamente diferentes da serotonina e histamina na permeabilidade a

fluidos e macromoléculas, sugerindo que a serotonina abre diferentes caminhos daqueles abertos pela histamina.

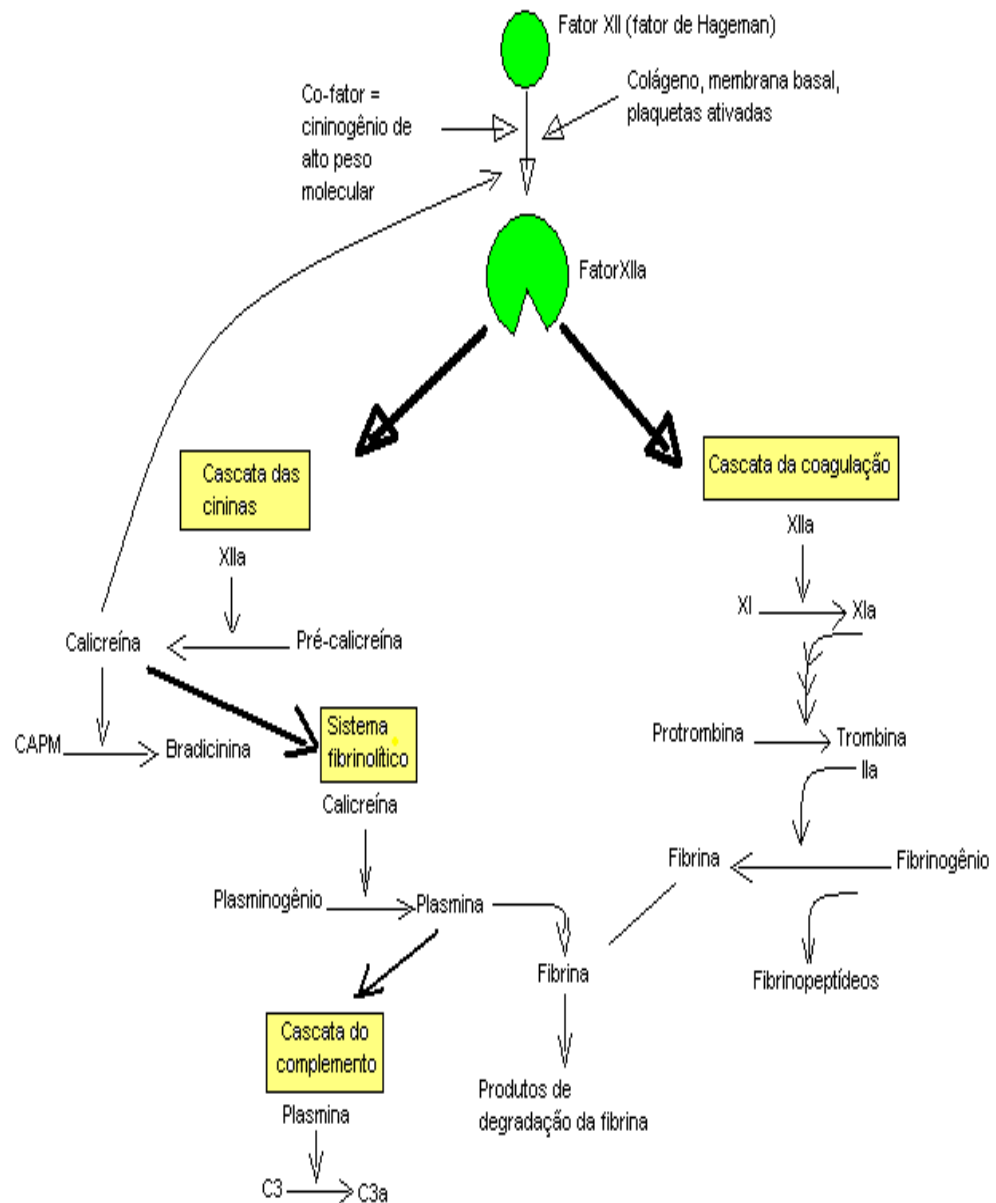
Cininas hipotensoras

As cininas se inter-relacionam a mais dois fatores derivados do plasma, o sistema do complemento e da coagulação (Figura 4). A bradicinina e a lisil-bradicinina são peptídeos cujo precursor é o cininogênio de alto peso molecular, presente na fração globulínica do plasma. As cininas são hormônios ativos localmente, liberados principalmente pela calicreína plasmática, e que dão origem a respostas inflamatórias clássicas como aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo local (BHOOLA et al., 1992).

Através da ligação aos receptores endoteliais B_2 , as cininas estimulam a liberação de vasodilatadores potentes como óxido nítrico (NO), prostaciclina, e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (HORNIG & DREXLER, 1997). Segundo OYVIN et al. (1972), a ativação dos receptores B_2 promove aumento do cálcio intracelular e subsequente retração endotelial, um acontecimento crítico na diapedese.

Por outro lado, a calicreína tissular tem sido localizada em neutrófilos e tem-se postulado o seu envolvimento com o extravasamento neutrofílico através do endotélio para os tecidos (FIGUEROA et al., 1989).

As cininas são agentes álgicos potentes. Sob a ação das prostaglandinas, os neurônios sensitivos tornam-se mais sensíveis à ação da bradicinina. Estudos demonstraram que a frequência de potenciais de ação de fibras C em resposta à bradicinina aumentou após a aplicação das prostaglandinas E_2 e E_1 (HANDWERKER, 1976; CHAHL & IGGO, 1977).



Fonte: COLLINS, 2000.

FIGURA 4 - Inter-relação entre cininas, complemento e coagulação.

Sistema Complemento

O sistema complemento compreende 20 proteínas encontradas em maior concentração no plasma e funciona na imunidade inata e adaptativa, defendendo o organismo contra agentes microbianos através da lise de micróbios pelo chamado complexo de ataque à membrana – CAM (REID et al., 1998). Na

formação do CAM, uma série de componentes do complemento são produzidos, causando aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia e opsonização (MORGAN, 1995).

Os fatores derivados do complemento executam uma série de fenômenos na inflamação aguda. Por exemplo, o receptor leucocitário CR3 para iC3b, tem sido envolvido na aderência dos leucócitos ao endotélio via uma fixação covalente do fragmento do complemento iC3b ao endotélio (MARKS et al., 1989), enquanto que C3a e C5a podem aumentar a expressão do receptor para adesão celular endotelial neutrofílico, induzir extravasamento vascular, atrair leucócitos por quimiotaxia e estimular a liberação de histamina e enzimas líticas na área afetada (KAJITA et al., 1990; MEUER et al., 1981).

Sistema da coagulação

A coagulação e a inflamação são dois processos intimamente conectados que fazem parte de uma única resposta defensiva do organismo. Alguns estudos já referiram o envolvimento da formação de fibrina no edema de pata induzido por carragenina, estabelecendo uma ligação entre a inflamação e a coagulação (WISEMAN, et al., 1968).

Atualmente sabe-se que o controle da geração de fibrina durante a ativação da cascata de coagulação depende de um balanço entre fatores procoagulantes e anticoagulantes. De acordo com CICALA et al (1998), após dano ao endotélio vascular, uma proteína receptora de alta afinidade para a trombina é liberada (trombomodulina). O complexo trombina-trombomodulina ativa a proteína C (PC), a qual forma um complexo com um co-fator, a proteína S (PS) no endotélio. A PC ativada inibe a coagulação e ativa a via fibrinolítica. Por outro lado, a trombina ativa a via da PC, agindo como um inibidor de sua própria produção por feedback negativo. Portanto, a presença de trombomodulina no endotélio e a integridade da via da PC são requisitos fundamentais para um correto balanço entre a coagulação e a fibrinólise. Durante a inflamação, este balanço é alterado pois algumas citocinas (TNF- α) causam diminuição da expressão de PC e trombomodulina, provocando com isto uma tendência a um estado procoagulatório que pode levar a uma trombose crítica (ESMON et al., 1991).

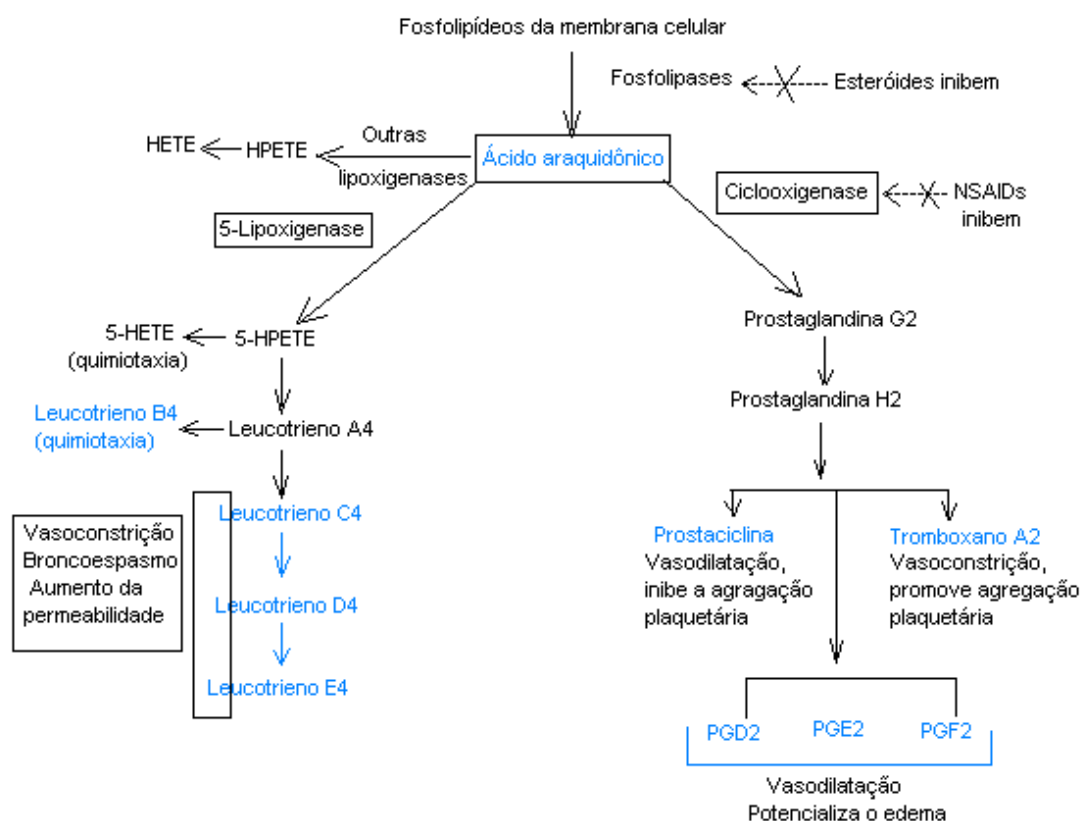
Um outro fator que deve ser considerado na relação da coagulação com a inflamação é o papel das plaquetas em ambos os processos. Sabe-se que as plaquetas, cuja principal função é a hemostasia, quando ativadas durante um processo inflamatório liberam de seus grânulos um grande número de substâncias que modificam a integridade tecidual (WILLIS, 1978).

A trombina também tem mostrado-se indutora de várias respostas celulares que estão envolvidas na inflamação, tais como: quimiotaxia para monócitos e neutrófilos (BIZIOS et al., 1986), mitogênese para diferentes tipos celulares (Mc NAMARA et al., 1993) e estimulação das células endoteliais com liberação de prostaciclina (PGI_2) (OHBA et al., 1996).

Metabólitos do ácido araquidônico

Prostaglandinas, leucotrienos e compostos relacionados são derivados do ácido graxo essencial que contém quatro duplas-ligações: ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico ou ácido araquidônico. O ácido araquidônico é liberado de fosfolípidos da membrana através da ativação de fosfolipases celulares (p.ex., fosfolipase A2) por estímulos químicos, hormonais, físicos e neuro-humorais (COLLINS, 2000).

Os metabólitos do ácido araquidônico são sintetizados por duas classes principais de enzimas: ciclooxigenases (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) e lipooxigenases (leucotrienos e lipoxinas) – (Figura 5).



Fonte: COLLINS, 2000.

FIGURA 5 - Geração de metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação.

Os metabólitos do ácido araquidônico possuem importantes propriedades farmacológicas. As prostaglandinas E2 e A2 são potentes vasodilatadores na maioria das espécies e na maioria dos leitos vasculares. As prostaglandinas E, F e A aumentam o débito cardíaco. A pressão arterial sistêmica cai em resposta às prostaglandinas E e A. O TXA2 é potente vasoconstritor no animal intacto e em várias preparações vasculares isoladas. A PGI2 causa pronunciada hipotensão, cerca de cinco vezes mais potente que o efeito produzido pela PGE2 (CARVALHO, 1998).

Os leucotrienos (produzidos pela ação das lipoxigenases sobre o ácido araquidônico) aumentam a permeabilidade vascular. LTB4 é potente agente quimiotático para leucócitos polimorfonucleares e ativador das respostas funcionais de neutrófilos como a agregação e aderência de leucócitos ao endotélio venular,

geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas (ARNOULD et al., 2001).

As lipoxinas são geradas através de mecanismos de interação entre diferentes tipos celulares (biossíntese transcelular). A biossíntese de mediadores através de interações transcelulares e célula-célula é reconhecida como um importante meio pelo qual o organismo consegue amplificar e gerar mediadores derivados de lipídeos, particularmente aqueles produzidos pelas lipoxigenases. O ácido araquidônico e seus produtos de oxigenação podem transferir-se de uma célula a outra durante a interação célula-célula sendo mais tarde transformados em compostos biologicamente ativos “pro-” e “anti” inflamatórios (FIERRO et al., 2001).

As lipoxinas possuem várias ações biológicas, sendo algumas pró-inflamatórias e outras antiinflamatórias. Causam vasodilatação em modelos *in vivo* e *in vitro* (SERHAN, 1994). Em certos tecidos as lipoxinas podem estimular a formação de prostaciclina pelas células endoteliais, o que pode contribuir para a vasodilatação. Estas ações prostanóide-dependentes podem ser inibidas por inibidores da ciclooxigenase e indicam que as lipoxinas podem estimular a biossíntese de uma segunda série de mediadores (DAHLEN et al., 1991).

Atualmente avalia-se que as lipoxinas são potentes reguladores dos mediadores endógenos pró-inflamatórios, incluindo lipídios (leucotrienos, PAF) e citocinas (TNF- α , IL-6), resultando na inibição da inflamação leucócito-dependente (SERHAN, 1997).

Análogos das lipoxinas representam ferramentas muito úteis para avaliar o potencial da manipulação farmacológica do processo inflamatório com a intenção de se desenvolver terapias antiinflamatórias novas e seletivas com reduzidos efeitos colaterais indesejáveis.

Mecanismo de ação antiinflamatória dos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs)

O mecanismo antiinflamatório dos AINEs está relacionado principalmente a uma redução na síntese de prostaglandinas pela inibição da enzima ciclooxigenase (prostaglandina-endoperóxido sintase) que catalisa a conversão de ácido araquidônico a PGH₂, a primeira reação requerida para a biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos (IÑIGUEZ et al., 1999).

Pelo menos duas isoformas da enzima são expressas nos tecidos dos mamíferos: ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). A isoforma COX-1 é constitutivamente expressada na maioria dos tecidos dos mamíferos e está envolvida na regulação de funções fisiológicas normais, tais quais: a secreção ácida gástrica e o funcionamento dos rins (WILLIAMS et al., 1997).

A atividade da isoforma COX-2 pode ser aumentada por citocinas, fatores de crescimento e promotores tumorais, o que sugere sua relevância para o processo inflamatório e o câncer (LEE et al., 1992; KUJUBU et al., 1992), levando à hipótese que ela é a principal responsável pela produção de prostaglandinas na inflamação.

Várias drogas têm sido testadas com relação a suas seletividades para COX-2, e esse interesse é baseado na noção de que COX-1 predomina no estômago, produzindo prostaglandinas citoprotetoras da mucosa gástrica, enquanto que a COX-2 é induzida na inflamação, dando origem à dor e edema provenientes do processo inflamatório (KLEIN et al., 1994).

A injúria à mucosa gastrointestinal desenvolve-se quando o efeito deletério do ácido gástrico sobrepuja as propriedades defensivas da mucosa. As teorias com relação à injúria da mucosa gastroduodenal relacionada aos AINEs envolvem múltiplos mecanismos, com efeitos tanto locais como sistêmicos (LANZA, 1993). Os efeitos sistêmicos dessas drogas parecem ser os principais responsáveis pelos danos teciduais e ocorrem principalmente pela inibição da síntese de prostaglandinas endógenas, levando à diminuição da produção de muco, da secreção de bicarbonato, do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, da proliferação epitelial e da resistência da mucosa à injúria. A diminuição na resistência da mucosa permite a ação deletéria de fatores endógenos, incluindo ácido, pepsina e sais biliares, assim como fatores exógenos como AINEs, etanol e outros agentes nocivos (WHITTLE, 1977; WOLFE et al., 1988).

Os inibidores da COX-2 podem ser preferenciais (meloxicam, nimesulide, etodalac e nabumetone) ou seletivos (celecoxib, rofecoxib). Tem sido proposto que o termo seletivo deve ser usado para agentes que inibem a COX-2, mas não têm efeito na COX-1, em todas as gamas de doses e concentrações utilizadas na prática clínica (HAWKEY, 1999).

Apesar da evidência de que um inibidor seletivo para COX-2 é mais seguro que um AINE não seletivo, existem alguns questionamentos. Por exemplo, a

COX-2, assim como a COX-1, têm sido detectadas no epitélio gastrointestinal aparentemente normal, o que pode sugerir um efeito protetor da COX-2 na mucosa gástrica (ZIMMERMANN et al., 1998). Da mesma forma, há outras circunstâncias em que a COX-2 pode ser importante para a homeostase na saúde ou doença. Na gastrite induzida por *Helicobacter pylori*, tem sido demonstrado o aumento na expressão de COX-2 (Mc CARTHY et al., 1999). A expressão de COX-2 também é aumentada na margem de úlceras em cicatrização e a sua inibição tem demonstrado retardar a cicatrização das úlceras em modelos animais (MIZUNO et al., 1998).

A utilização dessas novas drogas gera ainda riscos a componentes do sistema cardiovascular e à função renal. A observação de que a expressão de COX-2 é aumentada por citocinas, fatores de crescimento, ésteres de forbol e lipopolissacarídeo em células endoteliais de cultura e em células da musculatura lisa vascular sugerem que a COX-2 tem um importante papel no aumento da formação de PGI₂ que ocorre em síndromes clínicas de ativação plaquetária (FITZGERALD et al., 1984). Os inibidores da COX-2 diminuem a excreção urinária de metabólitos da PGI₂ em sujeitos normais, indicando que a produção de PGI₂ também é reduzida (Mc ADAM et al., 1999; FITZGERALD et al., 1981). A PGI₂ é parte de um mecanismo de defesa homeostático que limita as conseqüências da ativação plaquetária in vivo. Portanto, existe um aumento do risco de trombose em pacientes predisponentes que estejam tomando inibidores seletivos para COX-2. De fato, trombose arterial foi relatada em quatro pacientes portadores de lúpus anticoagulante após a iniciação de terapia com celecoxib (CROFFORD et al., 2000).

Com relação à função renal, sabe-se que a formação de prostaglandinas dependente da COX-2 é necessária para o desenvolvimento renal normal. Em camundongos, a ausência de COX-2 resulta em displasia renal severa caracterizada por uma interrupção pós-natal da maturação na zona nefrogênica subcapsular e uma deterioração progressiva da função renal com o aumento da idade (DINCHUK et al., 1995).

A presença de ambas isoformas da ciclooxigenase na vasculatura renal (NANTEL et al., 1999) levanta a questão de qual é a fonte principal do aumento na produção de prostaglandinas vasodilatadoras que são críticas para a preservação do fluxo sanguíneo renal na presença da depleção de volume. A inibição desta resposta homeostática dá origem aos efeitos colaterais renais mais comuns associados à terapia com AINEs não-seletivos (PATRONO et al., 1987).

Atualmente, além da procura de inibidores cada vez mais seletivos para a COX-2, tentam-se alternativas para diminuir o risco de efeitos adversos gastrointestinais, como, por exemplo, o uso concomitante de antagonistas do receptor H₂, inibidores da bomba de prótons, administração de prostaglandinas exógenas (misoprostol), sucralfato, AINEs contendo óxido nítrico e principalmente o desenvolvimento de AINEs cada vez mais seguros (LANZA, 1998; CALDWELL et al., 1987; EHSANULLAH et al., 1988; GRAHAM et al., 1993; WALLACE et al., 1994).

Fator de ativação plaquetária

O PAF é um fosfolípídeo biologicamente ativo, inicialmente descrito pelos seus efeitos como agregante plaquetário e como um produto liberado pelos basófilos (BENVENISTE et al., 1972). Atualmente sabe-se que o PAF pode ser produzido por muitas células inflamatórias, incluindo leucócitos, plaquetas, macrófagos e células endoteliais. O PAF tem sido considerado um mediador de processos inflamatórios agudos, respostas sistêmicas ao choque e reações alérgicas (KAMINSKI et al., 1990). O PAF tem mostrado diversas ações pró-inflamatórias, entre elas a estimulação da formação de eicosanóides, produção de superanion, captação de cálcio e ativação da fosfolipase A₂ (MYERS et al., 1995).

Citocinas e quimiocinas

Em contraste aos hormônios, que têm sido mais comumente associados ao “sistema endócrino”, as citocinas têm sido classicamente associadas ao “sistema imune”. De acordo com THOMSON (1991), a definição de “citocinas” seria a seguinte: “proteínas regulatórias secretadas por células sanguíneas brancas e uma variedade de outras células no corpo; as ações pleotrópicas das citocinas incluem numerosos efeitos nas células do sistema imune e modulação das respostas inflamatórias”.

Sob qualquer definição, o termo “citocina” compreende as “monocinas” (mediadores derivados dos monócitos/macrófagos) e “linfocinas” (mediadores derivados dos linfócitos) (TURNBULL et al., 1999).

As principais citocinas que medeiam a inflamação são a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral – TNF (α e β). A IL-1 e o TNF compartilham muitas propriedades biológicas (DINARELLO, 1996; BEUTLER, 1995).

Durante o processo inflamatório, as citocinas atuam em inúmeros processos. Por exemplo, a síntese de proteínas de fase aguda é um mecanismo protetor do organismo durante condições de sofrimento, inflamação e endotoxemia. As proteínas de fase aguda geram um mecanismo de tamponamento que protege o organismo das ações deletérias dos mediadores pró-inflamatórios que são produzidos em larga escala durante doenças inflamatórias agudas e crônicas (BAUMANN et al., 1994). A síntese e a liberação de proteínas de fase aguda de classe 1 é iniciada pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α via um mecanismo que é mediado pela interleucina-6 (IL-6) (COUPADE et al., 2001).

Um papel importante para o TNF- α na inflamação foi estabelecido por observações de que muitas reações inflamatórias estão prejudicadas em camundongos deficientes de TNF ou de receptores para TNF (DOUNI et al., 1995) e que, em humanos, inibidores de TNF são antiinflamatórios eficazes (FELDMANN et al., 2001).

No endotélio, o TNF induz a síntese de moléculas de aderência endotelial e mediadores químicos, produção de enzimas associadas à remodelação da matriz e aumentos da trombogenicidade superficial do endotélio (POBER et al., 1990).

As quimiocinas são principalmente proteínas homólogas de 8 a 10 KD que são subdivididas em quatro famílias (C, CC, CXC e CX₃C) baseadas na posição relativa dos resíduos de cisteína na proteína madura (VOLIN et al., 2001).

As quimiocinas são secretadas em sítios de inflamação e infecção por células teciduais residentes, leucócitos residentes e recrutados e células endoteliais ativadas por citocinas. O aumento dramático na secreção de quimiocinas durante a inflamação resulta no recrutamento seletivo de leucócitos para dentro do tecido inflamado (LUSTER, 1998).

Os principais estímulos para a produção de quimiocinas são citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e TNF- α , produtos bacterianos (lipopolissacarídeo) e infecção viral. (BAGGIOLINI et al., 1994). A capacidade de controlar precisamente o movimento de células inflamatórias sugere que as várias quimiocinas e seus receptores podem gerar novos alvos para intervenções terapêuticas (LUSTER, 1998).

Algumas quimiocinas, como a eotaxina e as proteínas quimioatratadoras de monócitos, são potentes quimioatratadores de eosinófilos e fatores de liberação de

histamina, tornando-as particularmente importantes na inflamação alérgica. De fato, estas quimiocinas podem ser os principais fatores de liberação de histamina na ausência do antígeno e anticorpo IgE (LUSTER et al., 1997).

Óxido Nítrico

O NO é gerado via a oxidação da L-arginina pela enzima chamada óxido nítrico sintase (NOS) (NATHAN, 1997).

Existem três isoformas da NOS identificadas, duas são expressas constitutivamente, sendo dependentes de cálcio/calmodulina e classificadas como endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) e uma é induzível por citocinas e é independente de cálcio/calmodulina – iNOS (MONCADA et al., 1995).

A liberação de NO pelas óxido nítrico sintases constitutivas ocorre em quantidades pequenas e por um período curto de tempo e o NO nestas circunstâncias tem um importante papel no sistema cardiovascular onde ele controla a distribuição do fluxo sanguíneo no órgão, inibe a agregação e adesão das plaquetas à parede vascular e inibe a adesão leucocitária e a proliferação celular no músculo liso. Em contraste, a isoforma induzível da NOS não está continuamente presente, mas sim expressa em uma grande variedade de células em resposta ao estímulo inflamatório como citocinas e lipopolissacarídeo (SALVEMINI, 1997).

Existe uma ligação entre as vias da NOS e das ciclooxigenases, e o NO pode aumentar a produção de prostaglandinas. Esta propriedade do NO é atribuído à sua capacidade de ativar as enzimas ciclooxigenases (SALVEMINI et al., 1993).

A inibição da produção de NO por inibidores seletivos da iNOS está associada com profunda inibição não somente da liberação de NO, mas também de prostaglandinas. Por exemplo, no modelo de inflamação aguda induzido pela carragenina, a inibição do edema com L-NIL (N-iminoetil-L-lisina), um inibidor seletivo da iNOS, está associada com uma inibição dose-dependente da liberação de NO e uma inibição clara de prostaglandinas pró-inflamatórias (SALVEMINI et al., 1996).

O importante papel do NO na inflamação está relacionado a várias ações: relaxamento do músculo liso vascular (vasodilatação), redução da agregação e aderência plaquetária, redução do recrutamento de leucócitos, ação citostática e citotóxica através de mecanismos mediados por radicais livres que são protetores

contra agentes infecciosos e células tumorais, mas que também podem ser lesivos para o próprio organismo, contribuindo para o estabelecimento de doenças inflamatórias (RIBBONS et al., 1997).

Constituintes lisossômicos dos leucócitos

Monócitos e neutrófilos contêm grânulos lisossômicos com várias substâncias que podem contribuir para a resposta inflamatória, principalmente proteases ácidas e básicas (COLLINS, 2000).

Após a adesão ao endotélio vascular, os neutrófilos migram para o sítio infectado onde eles liberam radicais livres de oxigênio e seus constituintes internos, incluindo grânulos de proteínas azurófilos (BORREGAARD, 1997).

Recentemente foram descobertos muitos mecanismos potencialmente patogênicos pelos quais proteinases e mieloperoxidases liberadas de grânulos neutrofílicos produzem efeitos deletérios nos tecidos e células em múltiplos modelos experimentais (KAO et al., 1988; JOHNSON et al., 1987). Estas proteases degradam moléculas da matriz extracelular como a elastina, fibronectina, laminina, vitronectina, e colágeno tipo IV resultando na destruição tecidual típica de alguns processos inflamatórios purulentos (RAO et al., 1991; BORREGAARD et al., 1997).

Outros substratos conhecidos de proteases incluem fatores de transcrição e citocinas (TNF- α , IL-1), além de estimularem a produção de interleucina-8 e serem capazes de penetrar nas células e causar eventos tóxicos (YANG et al., 2001).

Radicais livres derivados de oxigênio

O estresse oxidativo agudo e crônico ao endotélio vascular causa séria disfunção nas células endoteliais e desempenha um importante papel na patofisiologia de várias doenças inflamatórias. Dois aspectos da disfunção endotelial podem ser particularmente importantes na determinação da doença inflamatória: o aumento da permeabilidade vascular e o aumento da adesão endotelial para os leucócitos, ambos fatores críticos para a formação do edema e extravasamento de leucócitos (LUM et al., 2001).

Espécies reativas de oxigênio funcionam como moléculas sinalizadoras, estimulando atividades celulares que vão desde a secreção de

citocinas e quimiocinas até a proliferação celular e, em altas concentrações, elas podem produzir injúria e morte celular por modificação oxidativa de proteínas e carboidratos e peroxidação de lipídios. Estas respostas diversas estão relacionadas a vários fatores, tais como as espécies prevalentes no local da inflamação, concentração dos oxidantes e a capacidade antioxidante local assim como as células-alvo (LANDER, 1997).

Com a geração de O_2^- , outros intermediários mais reativos também são produzidos pela dismutação enzimática ou espontânea do O_2^- (equação 1).



Na presença de metais de transição (Fe^{3+}), O_2^- reduz Fe^{3+} a Fe^{2+} pela reação de Haber-Weiss (equação 2). O ferro reduzido reage com H_2O_2 via a reação de Fenton (equação 3) para gerar o radical hidroxila altamente reativo $\cdot OH$



Além disso, o O_2^- pode reagir com NO, para formar peroxinitrito, que se decompõe e forma uma potente espécie reativa de oxigênio associada ao radical hidroxila (ROS $\cdot OH$) e $NO_2\cdot$ (BECKMAN et al., 1990).

Os radicais livres derivados de oxigênio, assim como outros mediadores edematogênicos (trombina, histamina e $TNF-\alpha$), causam no endotélio a formação de “gap” intercelular, mudança na forma celular e reorganização dos filamentos de actina e miosina (LUM et al., 1994).

Além dos efeitos já descritos, o estresse oxidativo também estimula a produção e liberação do fator de ativação plaquetária nas células endoteliais (LEWIS et al., 1988).

Neuropeptídeos

Entre os peptídeos liberados por fibras C, as taquicininas, substância P e neurocinina A são moduladores conhecidos do processo inflamatório (BJORLING et al., 1994).

A substância P e seu receptor são largamente distribuídos e implicados na regulação de uma grande variedade de vias inflamatórias, tais quais a ativação de células endoteliais vasculares, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma e expressão de moléculas de adesão (LU et al., 1997; SABAN et al., 1997).

Produtos da degranulação dos mastócitos ativam fibras sensoriais C para liberarem substância P e, portanto, induzir inflamação (BJORLING et al., 1994). A esse respeito, experimentos recentes indicam que camundongos deficientes do receptor para substância P (NK-1R^{-/-}), não desenvolvem uma resposta inflamatória à estimulação pelo complexo antígeno-anticorpo. Estes resultados indicam um papel importante da substância P e seu receptor na modulação dos efeitos da degranulação dos mastócitos (BOZIC et al., 1996).

A substância P também induz a liberação de outros mediadores, como a bradicinina, que ativa o seu próprio receptor (SABAN et al., 1997).

1.3 Mecanismo de Ação Analgésica dos AINEs

Em diversos estudos a dor foi provocada por diferentes mediadores tais como as aminas acetilcolina, serotonina (5-HT), histamina e peptídeos como angiotensina, substância P e bradicinina (STEEN et al., 1996; KESSLER et al., 1992).

A ação excitatória da bradicinina e da serotonina em nociceptores cutâneos já está estabelecida e sabe-se que a serotonina pode aumentar a resposta dos nociceptores à bradicinina (LANG et al., 1990).

Os efeitos algogênicos da bradicinina parecem depender em parte de uma ação sensibilizante pela prostaglandina E₂, que é liberada em muitos tecidos em resposta à bradicinina. Essa teoria é suportada pelo efeito supressivo que os inibidores da síntese de prostaglandinas causam na resposta dos nociceptores à estimulação com bradicinina (MIZUMURA et al., 1987; RUEFF et al., 1993).

Por outro lado, alguns autores relatam que a prostaglandina E_2 pode modular a nocicepção não somente pela sensibilização de nociceptores periféricos, mas também por suas ações ao nível de sistema nervoso central (OKA et al., 1997).

A PGI₂ tem sido descrita como agente hiperalgésico mais potente que a PGE₁ e PGE₂, porém com atividade mais imediata e de menor duração que estas.

De acordo com SAUER et al. (1998), a atividade analgésica dos AINEs deve-se ao bloqueio da síntese de prostaglandinas por inibição da ciclooxygenase e não afeta diretamente o curso da hiperalgesia ou a dor causada pela ação direta das prostaglandinas.

1.4 Mecanismo de Ação Antipirética dos AINEs

De acordo com CASTILLO et al. (1983), em essência a febre representa um transtorno na termoregulação normal. Os mecanismos termostáticos são regulados pelo hipotálamo anterior, o qual recebe informações dos receptores periféricos e centrais. Quando a temperatura ambiente ou interna aumenta ou diminui, estes receptores enviam as informações a este termostato que ajusta apropriadamente o impulso eferente que modifica a produção ou perda de calor. Pacientes com febre devida à infecção ou outros quadros inflamatórios estimulam a produção e liberação de pirógenos endógenos (p.ex., Interleucinas, TNF- α) que aumentam o limiar crítico do hipotálamo e a temperatura corporal se mantém agora ao nível desse ponto mais elevado.

De acordo com KLUGER (1991), a febre está em geral associada a muitas condições fisiopatológicas mediadas por prostaglandinas e citocinas produzidas de maneira endógena tais quais a interleucina-1 β , IL-6 e TNF- α .

Segundo ROTH et al. (2001), durante a febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS), há o aparecimento de várias citocinas na corrente sanguínea. Estas citocinas, quando administradas perifericamente, produzem febre de padrão similar ao observado para o LPS, o que reforça a hipótese de que esses mediadores endógenos podem agir como sinais humorais para o cérebro para induzir febre em resposta a estímulos inflamatórios ou infecciosos.

Foi constatado que as prostaglandinas da série E têm importante participação na ação dos pirogênicos no SNC. A PGE₂ atua na área pré-óptica do

hipotálamo anterior e, portanto, age como modulador na regulação da temperatura. Injeção central de prostaglandinas produz febre (ZEISBERGER, 1999).

A ativação da fosfolipase A2 e o aumento da secreção de $\text{TNF-}\alpha$ poderiam levar à geração de prostaglandinas específicas que participam tanto nas reações inflamatórias quanto nas febris. A ação de drogas antiinflamatórias sobre a febre seria através da inibição da síntese de prostaglandinas e a conseqüente supressão do estado febril (HOECK et al., 1993).

2 RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Tendo em vista a larga utilização dos compostos de origem liquênica, o grupo de liquenologia da UFPE vem realizando estudos da atividade biológica deste grupo taxonômico há quase duas décadas. Durante este período, tem sido demonstrada a capacidade da micota liquenizada do nordeste frente a distintos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, cujos resultados foram considerados satisfatórios nestes estudos multidisciplinares. São relatadas ações antineoplásica, analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana (PEREIRA, 1998).

Com base nestes dados relevantes, este estudo analisou o potencial farmacológico dos compostos de *Cladonia verticillaris*, encontrada sobre solos arenosos de tabuleiros do município de Mamanguape - PB, particularmente no que se refere às suas atividades antiinflamatória, antipirética e antinociceptiva.

Pretende-se, dessa forma, contribuir para a descoberta e utilização de novos fármacos derivados de produtos naturais, com maior eficácia e que apresentem menor toxicidade e efeitos colaterais, colaborando assim para o aumento do arsenal terapêutico.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Investigar a atividade antiinflamatória, antinociceptiva e antipirética do líquen *Cladonia verticillaris* coletado em solos arenosos de tabuleiros do município de Mamanguape – PB.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito do extrato acetônico obtido de *C. verticillaris*, em modelos experimentais de inflamação aguda (edema de pata induzido por carragenina e dextrana), inflamação crônica (artrite induzida por formaldeído), inflamação subcrônica (lesão granulomatosa induzida por “pellets” de algodão), febre induzida por lipopolissacarídeo e algesia (teste da placa quente e teste de “writhing”) em ratos e camundongos.

- Avaliar o efeito do ácido fumarprotocetrárico isolado e purificado da espécie em estudo em modelos experimentais de inflamação aguda (edema de pata induzido por zimosan), febre induzida por lipopolissacarídeo e algesia (teste de “writhing”).

- Verificar o potencial ulcerogênico do extrato acetônico administrado de forma aguda, subcrônica e crônica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e Identificação do Líquen

A espécie *Cladonia verticillaris* (Raddi Fr.), pertencente à família Cladoniaceae e ocorrente sobre solos arenosos (cerrado) do município de Mamanguape (Paraíba, Brasil) foi utilizada no presente estudo (Figura 6).

As amostras líquênicas foram identificadas segundo suas características morfológicas e químicas de acordo com a metodologia descrita por AHTI et al. (1993) e CULBERSON (1972) e mantidas em caixas de papel à temperatura ambiente ($28 \pm 3^{\circ}\text{C}$) até a realização dos testes químicos e farmacológicos.

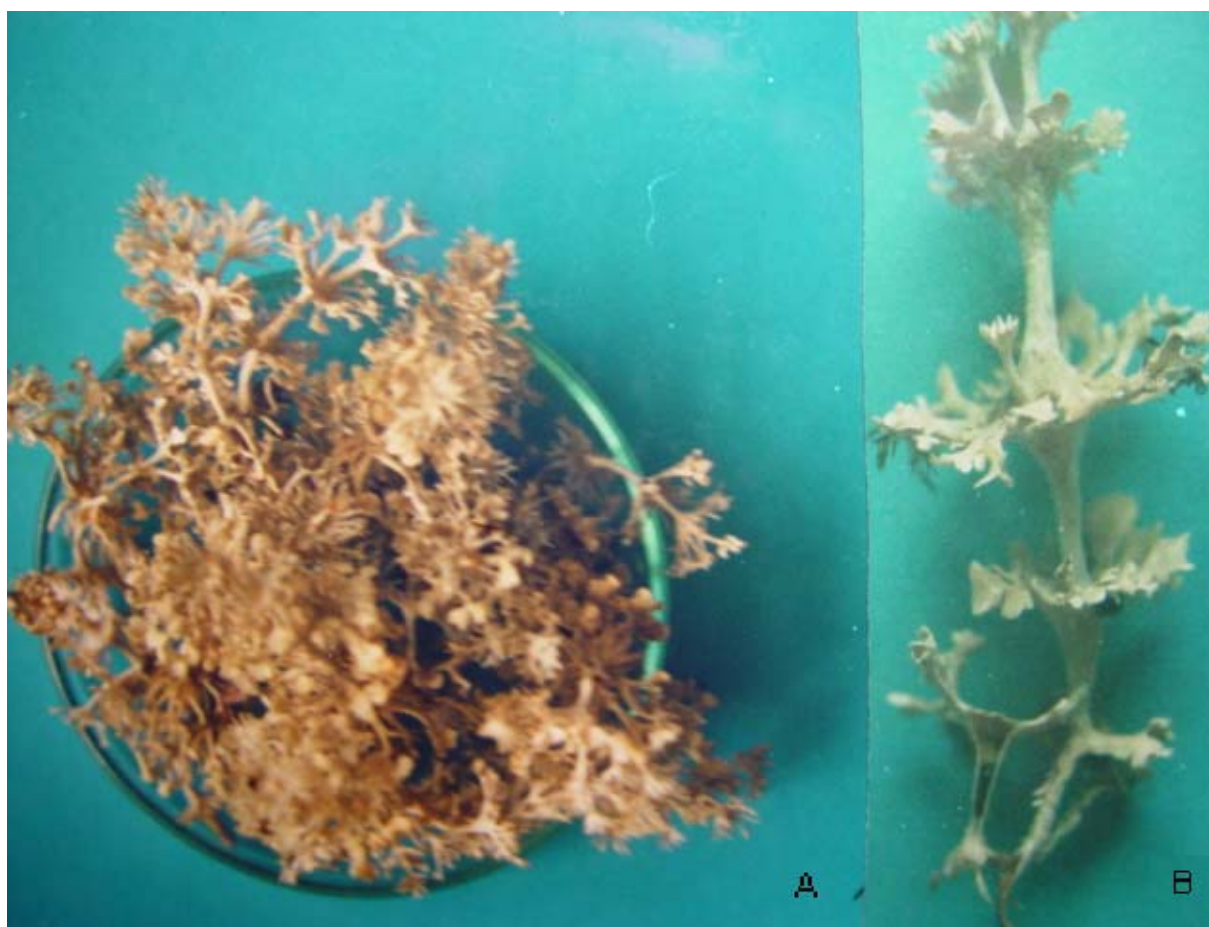


FIGURA 6 - *Cladonia verticillaris*. Vista do tufo líquênico (A) e do talo particularizado (B).

4.2 Preparação do Extrato Acetônico

O extrato acetônico foi obtido a partir de 20g do talo liquênico seco à temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) macerados em almofariz e submetidos a um extrator soxhlet por 48 horas. Após evaporação do solvente, o resíduo obtido foi mantido em dessecador até a obtenção de peso constante.

4.3 Isolamento e Purificação do Ácido Fumarprotocetrário

A extração do ácido fumarprotocetrário da espécie *Cladonia verticillaris* seguiu a metodologia descrita por ASAHINA & SHIBATA (1954), modificada por PEREIRA (1998).

Amostras de 20 g do talo liquênico seco foram triturados em almofariz, adicionados 150 mL de éter etílico, levados ao agitador mecânico por uma hora à temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$). Esse material foi mantido em repouso em geladeira por 48 horas e filtrado, separando o resíduo do extrato etéreo. Após completa evaporação do éter etílico, foram adicionados ao resíduo 150 mL de acetona, permanecendo em repouso em geladeira por 72 horas. Após este período o material foi novamente filtrado e o extrato acetônico obtido foi concentrado, em rotavapor, à metade de seu volume e mantido novamente em repouso até o aparecimento de um precipitado branco. Este foi filtrado usando um funil G4 e dissolvido em acetona a 50°C . O processo foi repetido por duas vezes, evaporado o solvente e levado ao dessecador até a obtenção de peso constante.

4.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato acetônico bruto e o ácido fumarprotocetrário isolado de *Cladonia verticillaris* foram analisados por CCD utilizando-se placas de 20X20 cm de sílica gel 60 F₂₅₄₊₃₆₆ MERCK com 0,25 mm de espessura seguindo a metodologia de CULBERSON (1972). Foram utilizados dois sistemas de solventes: A (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 v/v) e B (hexano/éter dietílico/ácido fórmico, 130:80:20 v/v).

Os padrões utilizados para identificar as substâncias liquênicas foram: ácidos fumarprotocetrário (FUM), protocetrário (PRO) e atranorina (ATR). A seleção dos padrões baseou-se na literatura sobre o estudo químico da espécie (PEREIRA, 1989; LEGAZ et al., 1986; AHTI et al., 1993). As cromatoplasmas foram

reveladas sob luz ultravioleta (254 nm e 366 nm), pulverizadas com ácido sulfúrico a 10% e aquecidas a 100 °C durante uma hora, para coloração das bandas. As substâncias foram identificadas pela comparação de seus valores de Rf com os dos padrões utilizados.

4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato acetônico (1mg/ml) e o ácido fumarprotocetrárico purificado (1 mg/ml) foram analisados utilizando-se cromatógrafo líquido HITACHI, acoplado a detector UV a 254 nm. Foram utilizadas como condições de análise: coluna de fase reversa C18, fase móvel em sistema isocrático (metanol:água:ácido acético, 80:19,5:0,5 v/v), atenuação 0,04, volume de injeção 20 µl, conforme metodologia de LEGAZ & VICENTE (1983).

4.6 Ensaios Farmacológicos

4.6.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos (200-300g) e camundongos albinos suíços de ambos os sexos (25-30g). Os animais foram criados em condições ambientais padrões (25 ± 2°C em um ciclo claro/escuro de 12 horas) e alimentados com água e ração *ad libitum* (Labina – Purina Nutrimentos LTDA).

4.6.2 Soluções e drogas utilizadas

- Solução salina (NaCl 0,9%).
- Ácido acético (MERCK).
- Indometacina (SIGMA).
- Carragenina tipo IV (lambda) (SIGMA).
- Maleato de dexclorfeniramina (SCHERING-PLOUGH).
- Lipopolissacarídeo (SIGMA).
- Paracetamol (JANSSEN-CILAG).
- Morfina (Cristália).
- Zimosan (SIGMA).
- Dextran (SIGMA).
- Fenilbutazona (SIGMA).

- Éter sulfúrico (Reagen).
- Formaldeído (Reagen).

Para realização dos ensaios farmacológicos, o extrato acetônico, o ácido fumarprotocetrárico e as drogas foram dissolvidos em salina com 2% de Tween 80 (veículo).

4.6.3 Determinação da toxicidade aguda

O extrato foi administrado através de gavagem (0,5 – 2g) em quatro grupos (10 animais/grupo) de camundongos albinos (25 – 30g) de ambos os sexos privados de ração durante 12 horas e permanecendo com água *ad libitum*. O percentual de mortalidade foi observado durante 48 horas e a toxicidade calculada de acordo com o método de MILLER & TAINTER (1944).

4.6.4 Atividade antinociceptiva

4.6.4.1 Teste de “writhing” (KOSTER et al., 1959).

Seis grupos (6 animais/grupo) de camundongos machos (25-30g) selecionados aleatoriamente foram tratados com o extrato acetônico (100 ou 200 mg/kg; v.o.), ácido fumarprotocetrárico (200 ou 400 mg/kg; v.o.), fenilbutazona (100 mg/kg; v.o.) ou veículo (5 mL/kg; v.o.). Trinta minutos após a administração dos compostos, as contorções abdominais foram induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6 % (10 mL/kg). Os animais foram colocados em gaiolas espaçosas e 3 minutos após a injeção do ácido foi iniciada a contagem de “writhings” exibida por cada animal durante um período de 10 minutos. Um “writhing” é caracterizado como uma seqüência de arqueamento dorsal, rotação pélvica e extensão dos membros posteriores.

A média de contrações abdominais para cada grupo foi determinada e a porcentagem de inibição da dor foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

Porcentagem de inibição = $1 - Vt/Vc \times 100$ onde Vt e Vc correspondem à média de “writhings” registrados nos grupos tratados com as drogas e veículo, respectivamente.

4.6.5 Inflamação aguda

4.6.5.1 Edema de pata induzido por carragenina (WINTER et al., 1962)

Para este teste foram utilizados três grupos (5 animais/grupo) de ratos Wistar machos (200-300g), privados de ração durante 12 horas, permanecendo com água *ad libitum*. Os animais foram tratados de acordo com seus grupos com extrato (200 mg/kg; v.o.), veículo (salina 0,9% e Tween 80, 5 mL/kg; v.o.) ou indometacina (10 mg/kg; v.o.). Uma hora após a administração dos compostos, a indução do edema foi procedida através de injeção subplantar de 0,1 mL de carragenina tipo IV (1% w/v em salina) na pata traseira direita de cada animal. O volume da pata injetada foi medido pletismograficamente (pletismômetro Ugo Basile) antes e 30, 60, 120 e 180 minutos após a injeção do agente edematogênico (Figura 7). O volume das patas foi expressa em mililitros e a variação pela diferença registrada no volume das patas antes e após a injeção de carragenina em cada intervalo de tempo já citado. A atividade antiedematogênica do extrato e da indometacina (droga padrão) foi calculada, de acordo com a fórmula abaixo, em termos de porcentagem de inibição:

Porcentagem de inibição = $1 - V_t/V_c \times 100$, onde V_t e V_c correspondem à média das diferenças resultantes das medidas das patas nos grupos tratados e controle, respectivamente.

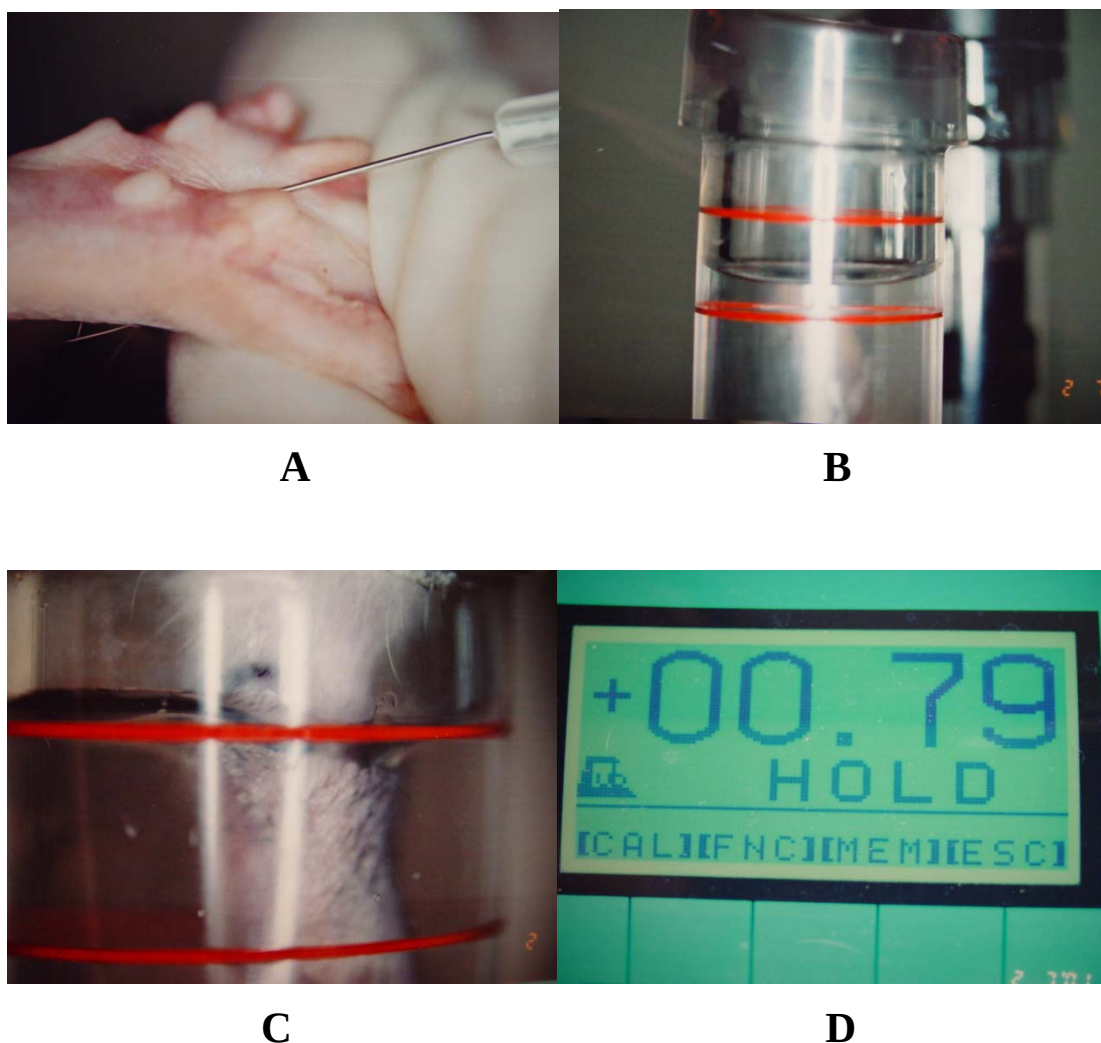


FIGURA 7 - **Edema de pata induzido por carragenina.** (A) Injeção subplantar de carragenina na pata; (B) Coluna de água do pletismômetro; (C) Imersão da pata na coluna de água; (D) Medição do volume de água deslocado (mL).

4.6.5.2 Edema de pata induzido por dextrana

Três grupos (5 animais/grupo) de ratos Wistar machos (200-300g) selecionados ao acaso foram tratados de acordo com seus grupos com extrato (200 mg/kg; v.o.), maleato de dexclorfeniramina (10 mg/kg; v.o.) ou veículo (5 mL/kg; v.o.). O procedimento para realização deste ensaio foi o mesmo descrito anteriormente. No entanto, o agente edematogênico utilizado foi a dextrana (PM=77.000) diluída em solução salina (10 mg/mL). Uma hora após a administração dos compostos, foi injetado 0,1 mL da solução de dextrana na pata traseira direita dos animais e a porcentagem de inibição do edema foi calculada conforme já descrito anteriormente.

4.6.5.3 Edema de pata induzido por zimosan (GADÓ & GIGLER, 1991)

Quatro grupos (5 animais/grupo) de ratos Wistar machos (200-300g) selecionados aleatoriamente foram tratados de acordo com seus grupos com ácido fumarprotocetrárico (25 ou 50 mg/kg; i.p.), indometacina (10 mg/kg; v.o.) ou veículo (5 mL/kg; v.o.). O procedimento para indução do edema foi semelhante àquele empregado nos dois métodos anteriores, à exceção do agente edematogênico que, neste caso, foi o zimosan (0,1 mL) diluído em salina (1mg/mL).

4.6.6 Inflamação subcrônica – lesão granulomatosa induzida por “pellets” de algodão (WINTER & POTER, 1957)

Três grupos (6 animais/grupo) de ratos Wistar machos (200-300g) foram tratados de acordo com os seus grupos com o extrato (200 mg/kg; v.o.), fenilbutazona (100 mg/kg; v.o.) ou veículo (5 mL/kg; v.o.). Os animais foram selecionados ao acaso e anestesiados com éter sulfúrico. Dois “pellets” de algodão (50 ± 1 mg) esterilizados foram assepticamente implantados na região subcutânea de cada lado da linha mediana dorsal do animal, próximo às axilas. Os compostos foram administrados diariamente em dose única, durante sete dias. No oitavo dia, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e os “pellets” granulomatosos foram dissecados e secos em estufa a 70 °C até a obtenção de peso constante. O peso dos “pellets” de algodão antes da implantação foi subtraído de seu peso após a dissecação e secura. A média do peso dos “pellets” secos foi determinada para todos os grupos e a porcentagem de inibição do granuloma em relação ao grupo controle foi calculada.

4.6.7 Inflamação crônica – artrite induzida por formaldeído (SELYE, 1949)

Três grupos (6 animais/grupo) de ratos Wistar machos selecionados aleatoriamente (200-300g) foram tratados com extrato (200 mg/kg; v.o.), indometacina (1,5 mg/kg; v.o.) ou veículo (5 mL/kg; v.o.). A artrite foi induzida pela injeção subplantar de 100 µL de formaldeído (2% v/v) na pata traseira esquerda dos ratos no 1° e 3° dias do experimento. O volume da pata foi medido por pletismômetro antes da injeção e durante 10 dias consecutivos ao tratamento com as drogas testadas. Durante este intervalo de tempo, os compostos foram

administrados diariamente em dose única. O aumento médio do volume das patas de cada grupo foi determinado a cada dia e calculada a porcentagem de inibição comparando-se os grupos tratados com o controle.

Com o objetivo de verificar o potencial ulcerogênico do extrato acetônico, administrado de forma aguda, subcrônica ou crônica, foram verificados os estômagos dos animais utilizados nos ensaios relativos ao edema de pata induzido por carragenina, lesão granulomatosa induzida por “pellets” de algodão e artrite induzida por formaldeído. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, seus estômagos removidos e seccionados ao longo da curvatura maior para observação detalhada com o auxílio de lupas.

4.6.8 Outros testes relevantes para drogas antiinflamatórias

4.6.8.1 Teste da placa quente (EDDY & LEIMBACH, 1959).

Foram selecionados três grupos (6 animais/grupo) de camundongos machos (25-30g), que já haviam sido expostos previamente (vinte e quatro horas) à placa e exibido respostas características ao estímulo. Estes animais foram tratados, de acordo com seus grupos, com extrato (200 mg/kg; v.o.), morfina (10 mg/kg; i.p.) ou veículo (5 mL/kg; v.o.). Trinta minutos após a administração da morfina e 60 minutos após a administração do extrato e veículo, cada animal foi exposto a uma placa metálica aquecida a uma temperatura constante (55 ± 1 °C) e foram registrados os segundos decorridos até que o animal exibisse uma resposta característica ao estímulo térmico. A resposta característica ao estímulo térmico consiste em lambes as patas anteriores e/ou saltar sobre a placa (“sapatear”). A latência em segundos para o surgimento da resposta foi utilizada como medida do efeito anti-nociceptivo do tratamento aplicado. A média do tempo de latência em segundos dos grupos tratados foram comparados àquela do grupo controle.

4.6.8.2 Atividade antipirética em ratos (PEROTTI et al., 1999)

Foram selecionados cinco grupos (7 animais/grupo) de ratos Wistar machos, que já haviam sido expostos previamente (vinte e quatro horas) à situação experimental para que se habituassem com o procedimento de medição de

temperatura. Estes animais foram tratados, de acordo com seus grupos, com extrato (200 mg/kg; v.o.), ácido fumarprotocetrário (25 ou 50 mg/kg; i.p.), paracetamol (250 mg/kg; v.o.) ou veículo (5 mL/kg; v.o.). Sessenta minutos após a administração dos compostos, a febre foi induzida pela injeção de lipopolissacarídeo (100 µg/kg; i.p.) dissolvido em solução salina 0,9% livre de pirógenos. A temperatura corporal de cada animal foi medida através da introdução retal de cerca de 3-4 cm de um termômetro digital (Becton Dickson, Brasil) durante um minuto. O procedimento foi realizado calmamente para não induzir aumento de temperatura pelo stress. As variações da temperatura retal dos animais de cada grupo foram registradas antes e 30, 60 e 120 minutos após a injeção do lipopolissacarídeo e comparadas com o grupo controle.

4.7 Testes Estatísticos

Os resultados obtidos nos testes foram expressos em média $\pm$ SD (desvio-padrão), onde **n** representa o número de experimentos. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$) ou 1% ($p < 0,01$). Foi utilizada a análise de variância ANOVA e os níveis de significância estatística ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) foram calculados através do teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação e Quantificação dos Componentes do Extrato Acetônico

Nos cromatogramas desenvolvidos com os sistemas de solventes A e B, foi constatado que o sistema B apresentou melhor resolução para separação dos constituintes fenólicos de *C. verticillaris* (Figura 8).

A CCD mostrou a presença de: ácidos fumarprotocetrárico e protocetrárico, atranorina e de diferentes bandas que podem corresponder a outras substâncias mencionadas por VICENTE et al. (1987).

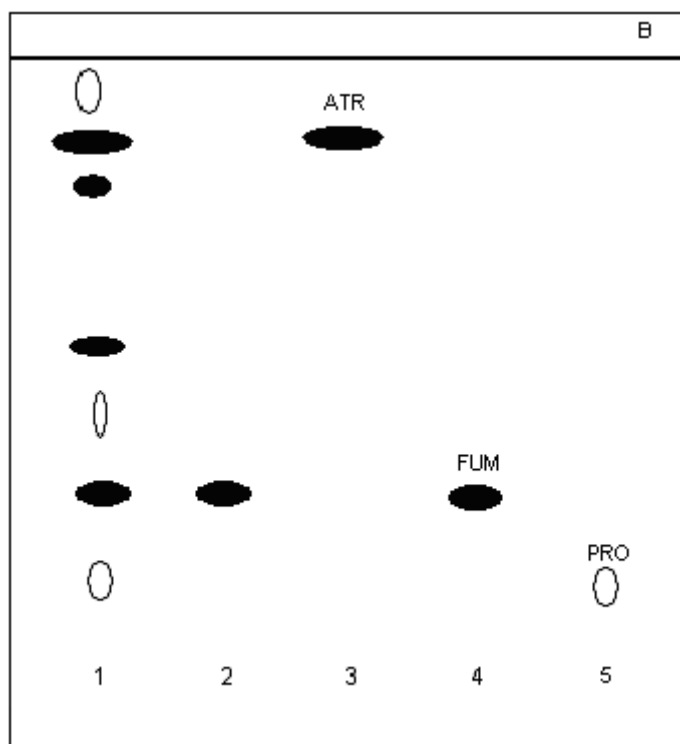


FIGURA 8 – CCD do extrato acetônico obtido de *Cladonia verticillaris*. 1. Extrato acetônico; 2. Ácido fumarprotocetrárico isolado; 3. Padrão de atranorina (ATR); 4. Padrão do ácido fumarprotocetrárico (FUM); 5. Padrão do ácido protocetrárico (PRO).

Através da CLAE também foi possível a identificação e quantificação dos três principais compostos referidos para *Cladonia verticillaris*: ácidos

fumarprotocetrário (TR=5.522) e protocetrário (TR=4.99), além da atranorina (TR=25.525) (Figura 9). As concentrações das substâncias estão indicadas na Tabela 1.

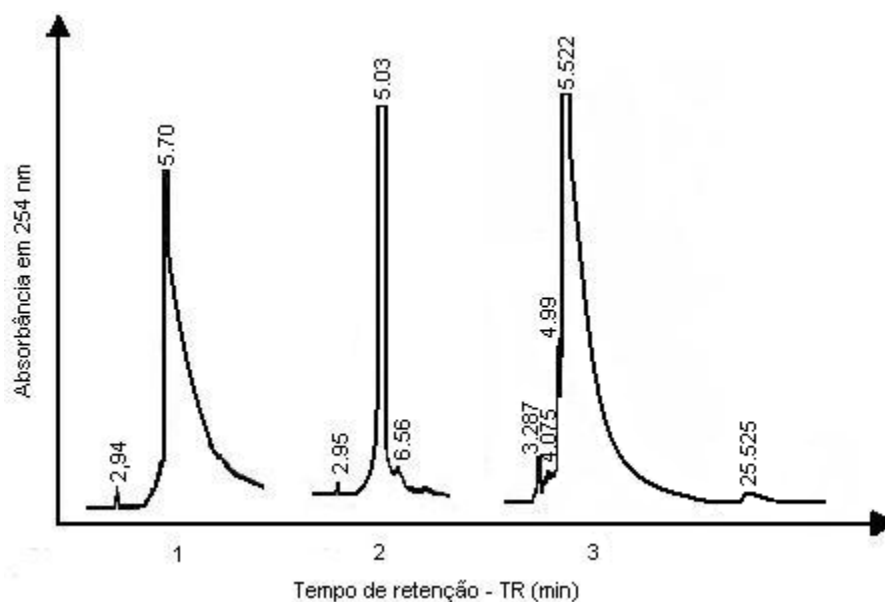


FIGURA 9 – CLAE do extrato acetônico de *Cladonia verticillaris*.
1. Ácido fumarprotocetrário; 2. Ácido protocetrário; 3. Extrato acetônico.

TABELA 1 – Concentração de substâncias no extrato acetônico obtido de *Cladonia verticillaris*.

Substâncias (TR)*	mg de substância/mg do extrato	% substância no extrato
Ácido fumarprotocetrário (5.522)	0,922	92,21
Ácido protocetrário (4.99)	0,039	3,96
Atranorina (25.525)	0,006	0,62

* TR = tempo de retenção.

5.2 Toxicidade Aguda

Os animais tratados com extrato (1g/kg; v.o.) não apresentaram nenhum indício de toxicidade, bem como não houve registro de morte. No grupo tratado com a dose de 2g/kg; v.o., o percentual de mortalidade foi 10% relativo à morte de 1 animal (fêmea) uma hora e 45 minutos após a administração do extrato.

5.3 Teste de “Writhing”

O extrato acetônico (100 ou 200 mg/kg; v.o.) e o ácido fumarprotocetrário (400 mg/kg; v.o.) inibiram as contrações abdominais induzidas por ácido acético com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2 – Efeito do extrato acetônico de *Cladonia verticillaris*, do ácido fumarprotocetrário e da fenilbutazona nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em seis camundongos por grupo.

Grupo	Dose (mg/kg; v.o.)	Contorções abdominais (n°)	Inibição (%)
Controle (veículo)	—	$14 \pm 1,51$	—
EA	100	$8,1 \pm 1,72 *$	42,14
EA	200	$5,8 \pm 0,75 *$	58,57
FUM	200	$9,88 \pm 0,91$	29,42
FUM	400	$5,6 \pm 2,65 **$	60
Fenilbutazona	100	$5,08 \pm 2,65 **$	63,71

EA = extrato acetônico

FUM = ácido fumarprotocetrário

Todos os resultados são expressos em média $\pm$ SD.

* $p < 0,05$ (ANOVA seguida do teste de Tukey).

** $p < 0,01$ (ANOVA seguida do teste de Tukey).

5.4 Edema de Pata Induzido por Carragenina

A injeção subplantar de carragenina causou edema de pata atingindo um pico máximo em três horas. O extrato acetônico (200 mg/kg; v.o.) exibiu uma inibição ($p < 0,05$) do edema aos 30 (20,18%) e 180 (28,85%) minutos, quando comparado ao grupo controle (Figura 10).

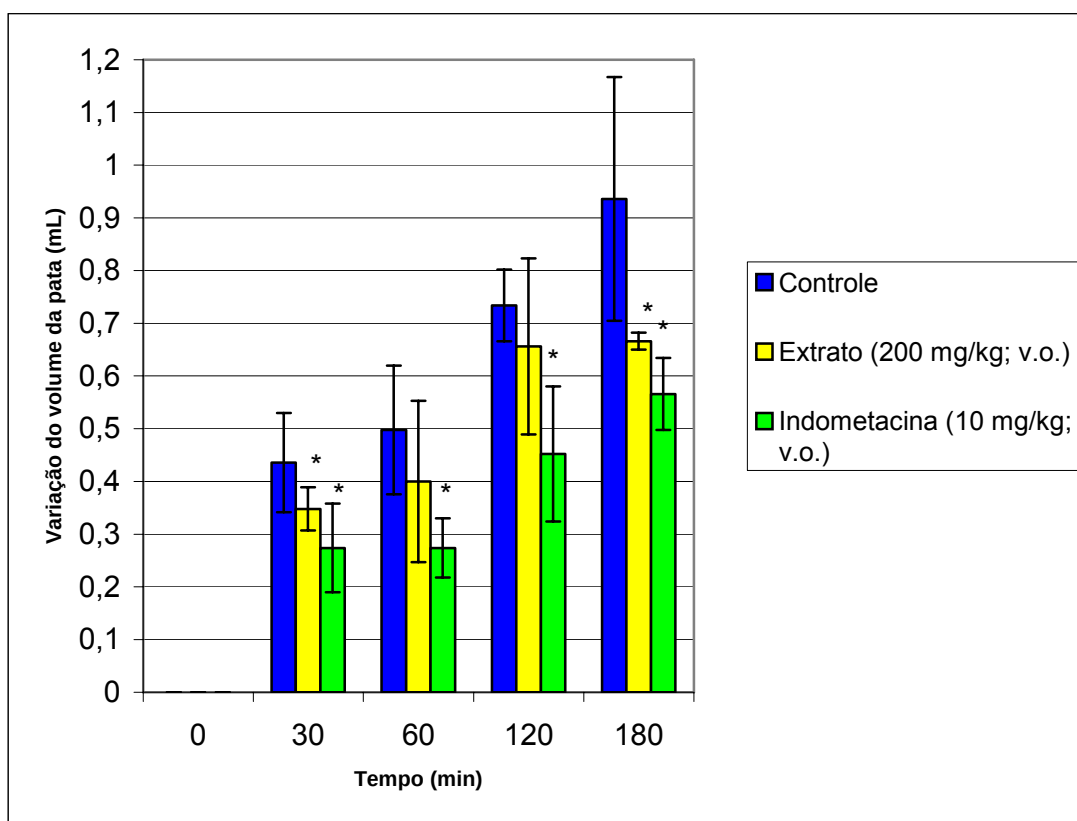


FIGURA 10 - Efeito do extrato acetônico (200 mg/kg; v.o.) e da indometacina (10 mg/kg; v.o.) no edema agudo de pata induzido pela injeção subplantar de 0,1 mL de carragenina tipo IV (5 animais/grupo).

* = $p < 0,05$ (ANOVA seguida do teste de Tukey).

5.6 Edema de Pata Induzido por Dextrana

De forma semelhante ao observado com o maleato de dexclorfeniramina (10 mg/kg; v.o.), o extrato acetônico (200 mg/kg; v.o.) mostrou inibição ($p < 0,05$) do edema causado por dextrana aos 60 (38,27%), 120 (42,12%) e 180 (50,95%) minutos, quando comparado ao grupo controle (Figura 11).

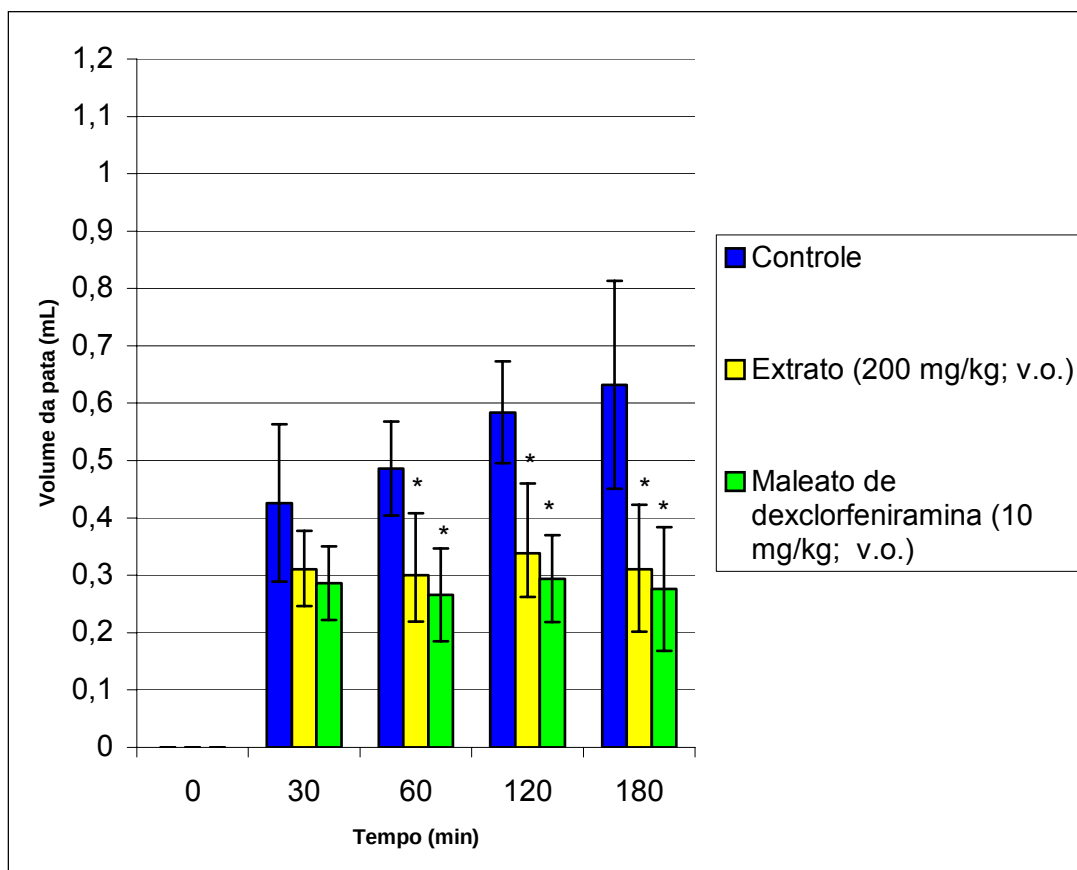


FIGURA 11 - Efeito do extrato acetônico (200 mg/kg; v.o.) e do maleato de dexclorfeniramina (10 mg/kg; v.o.) no edema agudo de pata induzido pela injeção subplatar de 0,1 ml de dextran. (5 animais/grupo).

* = $p < 0,05$ (ANOVA seguida do teste de Tukey).

5.6 Edema de pata induzido por zimosan

O ácido fumarprotocetrárico (25 ou 50 mg/kg; i.p.) e a indometacina (10 mg/kg; v.o.) inibiram ($p < 0,01$) a evolução do edema causado por zimosan em todos os tempos registrados no experimento (Figura 12).

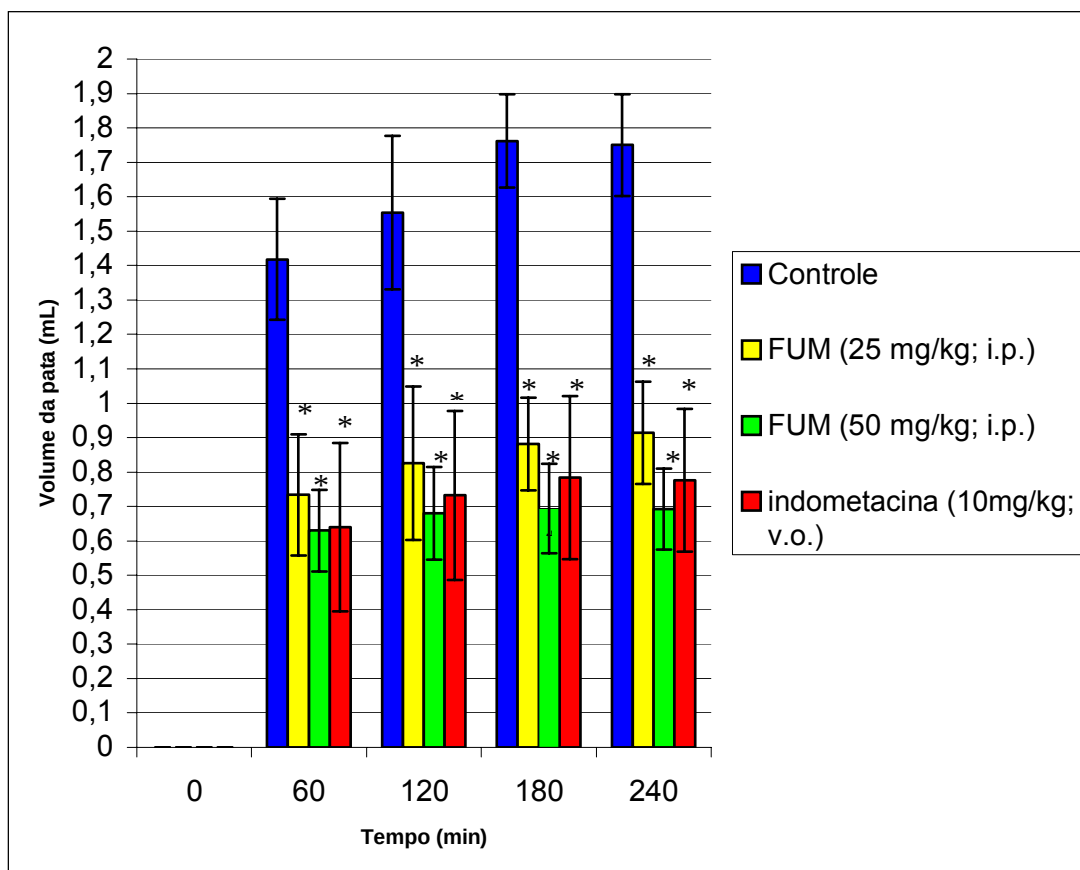


FIGURA 12 - Efeito do ácido fumarprotocetrárico (25 ou 50 mg/kg; i.p.) no edema agudo de pata induzido pela injeção subplantar de 0,1 ml de zimosan. (5 animais/grupo).

* = $p < 0,01$ (ANOVA seguida do teste de Tukey).

5.7 Inflamação Subcrônica – lesão granulomatosa induzida por “pellets” de algodão

O extrato acetônico (200 mg/kg; v.o.) não mostrou efeito significativo sobre a formação de tecido granulomatoso induzido por “pellet” de algodão, quando comparado com o grupo controle. A fenilbutazona (100 mg/kg; v.o.), por sua vez, inibiu significativamente ($p < 0,05$) a formação do granuloma quando comparada ao grupo controle Tabela Figura.

TABELA 3 – Comparação dos pesos dos granulomas dos grupos tratados com extrato acetônico de *Cladonia verticillaris* e indometacina em seis ratos por grupo.

Grupo	Dose (mg/kg; v.o.)	Peso do Granuloma (mg)	Inibição (%)
Controle (veículo)	—	73,4 ± 6,53	—
EA	200	71,19 ± 8,72	3,0
Fenilbutazona	100	52,11 ± 6,63 *	29,0

EA = extrato acetônico

Todos os resultados são expressos em média±SD.

* p < 0,05 (ANOVA seguida do teste de Tukey).

5.8 Inflamação Crônica – artrite induzida por formaldeído

As médias dos volumes das patas (ml) foram significativamente ($p < 0,05$) menores do 2° ao 10° dia do experimento no grupo tratado com extrato (200 mg/kg; v.o.) quando comparadas com o controle. No grupo tratado com indometacina (1,5 mg/kg; v.o.) a redução ($p < 0,05$) do edema, comparada com o controle, ocorreu do 3° ao 10° dia (Tabela 4).

TABELA 4 – Efeito do extrato acetônico e da indometacina de *Cladonia verticillaris* na artrite induzida por formaldeído em seis ratos por grupo.

Grupo	Dose (mg/kg; v.o.)	Volume da pata em ml após tratamento com as drogas									
		dia 1	dia 2	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6	dia 7	dia 8	dia 9	dia 10
Controle (veículo)	—	0,68 ± 0,196	0,673 ± 0,151	0,79 ± 0,173	0,598 ± 0,128	0,58 ± 0,152	0,526 ± 0,148	0,553 ± 0,137	0,663 ± 0,130	0,746 ± 0,132	0,585 ± 0,128
Extrato acetônico	200	0,568 ± 0,072	0,453 ± 0,084 *	0,410 ± 0,088 *	0,20 ± 0,06 *	0,180 ± 0,067 *	0,176 ± 0,072 *	0,170 ± 0,090 *	0,246 ± 0,054 *	0,290 ± 0,048 *	0,256 ± 0,039 *
Indometacina	1,5	0,646 ± 0,110	0,628 ± 0,094	0,566 ± 0,151 *	0,313 ± 0,069 *	0,295 ± 0,076 *	0,191 ± 0,066 *	0,256 ± 0,062 *	0,378 ± 0,052 *	0,423 ± 0,060 *	0,343 ± 0,073 *

Todos os resultados são expressos em média±SD. * p < 0,05 (ANOVA seguida do teste de Tukey).

5.9 Potencial Ulcerogênico do Extrato Acetônico

Os estômagos dos animais tratados com extrato e utilizados nos ensaios de edema de pata induzido por carragenina, inflamação subcrônica e crônica, não revelaram indícios de lesão gástrica.

5.10 Teste da Placa Quente

O extrato (200 mg/kg; v.o.) não mostrou atividade contra a dor induzida por estímulo térmico nos camundongos, ao contrário da morfina (10 mg/kg; i.p.) que aumentou significativamente o tempo de resposta a esse estímulo.

5.11 Atividade Antipirética em Ratos

A injeção intraperitoneal de LPS induziu uma resposta febril que persistiu por duas horas. O extrato (200 mg/kg; v.o.) e o ácido fumarprotocetrário (25 ou 50 mg/kg; i.p.) inibiram o aumento de temperatura ($p < 0,05$) aos 30 e 60 minutos, quando comparados ao grupo controle. O grupo tratado com paracetamol (250 mg/kg; v.o.) apresentou resultados semelhantes ao extrato (Tabela 5).

TABELA 5 - Efeito do extrato acetônico de *Cladonia verticillaris*, do ácido fumarprotocetrário e do paracetamol na febre induzida por lipopolissacarídeo em sete ratos por grupo.

Grupo	Dose (mg/kg)	VARIAÇÃO DA TEMPERATURA RETAL EM °C APÓS A INJEÇÃO DE LPS (MIN)		
		30	60	120
Controle (veículo)	—	$0,72 \pm 0,19$	$0,82 \pm 0,277$	$0,52 \pm 0,216$
Extrato acetônico	200 ^a	$0,195 \pm 0,24 *$	$0,38 \pm 0,178 *$	$0,60 \pm 0,298$
FUM	25 ^b	$0,40 \pm 0,158 *$	$0,50 \pm 0,122 *$	$0,52 \pm 0,083$
FUM	50 ^b	$0,20 \pm 0,158 *$	$0,36 \pm 0,151 *$	$0,32 \pm 0,216$
Paracetamol	250 ^a	$0,12 \pm 0,083 *$	$0,26 \pm 0,134 *$	$0,55 \pm 0,383 *$

FUM = ácido fumarprotocetrário.

Todos os resultados são expressos em média $\pm$ SD. * $p < 0,05$ (ANOVA seguida do teste de Tukey).

^a administração oral; ^b administração intraperitoneal.

6 DISCUSSÃO

Os compostos liquênicos localizam-se tanto no córtex quanto na medula e são extraídos por diferentes solventes orgânicos. A acetona é um dos solventes que possui alto poder extrator, por ter a capacidade de extrair estes compostos no córtex e na medula (ASAHINA & SHIBATA, 1954; HALE, 1983).

A CCD do extrato acetônico de *Cladonia verticillaris* mostrou a presença dos ácidos fumarprotocetrárico, protocetrárico e atranorina além de outras bandas que podem corresponder a substâncias mencionadas por VICENTE et al. (1987). Por outro lado, sabe-se que na biossíntese do ácido fumarprotocetrárico, há produção de compostos intermediários, como o ácido hipoprotocetrárico e seu aldeído, que podem corresponder a algumas das bandas não identificadas, conforme mencionam PEREIRA et al. (1999).

A CLAE do extrato acetônico comprovou a presença e quantificou os ácidos fumarprotocetrárico e protocetrárico, compostos majoritários de *Cladonia verticillaris*, além da atranorina. A CLAE mostrou que o ácido fumarprotocetrárico encontra-se em maior concentração (92,21%) em relação aos demais compostos.

Na triagem farmacológica de compostos bioativos, o estudo da toxicidade aguda possibilita, além da determinação da DL₅₀, a avaliação do(s) seu(s) efeito(s) sobre funções orgânicas importantes, tais como: locomoção, comportamento, sistema respiratório, dentre outros.

Os resultados do teste de toxicidade demonstraram que o extrato acetônico de *Cladonia verticillaris* apresenta baixa ordem de toxicidade, proporcionando uma boa margem de segurança para o uso em doses terapêuticas. Essa baixa toxicidade era esperada, visto que o extrato acetônico de *Cladonia verticillaris* contém, como constituintes principais, ácido fumarprotocetrárico e atranorina, que de acordo com MAIA et al. (2002) são também considerados de baixa ordem de toxicidade. Vale salientar que os extratos etéreo e clorofórmico de *Cladonia verticillaris* também não são considerados potencialmente tóxicos, visto serem bons extratores de atranorina, conforme SANTOS et al. (1996), que não encontraram registro de morte com o extrato clorofórmico de *Cladonia verticillaris* até a dose de 2g/kg (i.p.). Por outro lado, esses autores encontraram valor de DL₅₀ de 668 mg/kg (i.p.) para o extrato acetônico e de 106,3 mg/kg (i.p.) para o ácido fumarprotocetrárico isolado da referida espécie.

Vários agentes químicos (aloxano, bradicinina, salina hipertônica, 2-fenil-1,4-benzoquinona) têm sido aplicados intraperitonealmente para indução experimental de algesia (SILVA, 2001).

O teste de analgesia periférica ou teste de 'writhing' é um teste químico que simula a dor inflamatória local (VALENCIA et al., 1994). Os AINEs agem como drogas analgésicas principalmente de maneira periférica, isto é, no local de produção da dor ou próximo a ele, através da interferência no metabolismo do ácido araquidônico, mais especificamente inibindo a enzima ciclooxigenase (VANE, 1974).

A ação antinociceptiva do tipo periférica foi analisada utilizando-se o extrato acetônico e o ácido fumarprotocetrárico isolado. Ambos compostos demonstraram ação analgésica. No entanto, o extrato acetônico já demonstrou atividade antinociceptiva com a dose de 100 mg/kg; v.o., ao contrário do FUM que só demonstrou atividade antinociceptiva significativa com a dose de 400 mg/kg; v.o. Essas alterações podem estar relacionadas a fatores farmacocinéticos que envolvem mecanismos fisiológicos de absorção, distribuição e eliminação dos compostos estudados; podem também ser devidas à presença de outros princípios ativos no extrato bruto que podem estar atuando de forma sinérgica para desencadear a ação analgésica, já que os cromatogramas desenvolvidos neste trabalho mostraram a presença de outras substâncias, como por exemplo, a atranorina já referida como potente agente analgésico (SILVA, 1998).

Os resultados deste teste sugerem que parte dos efeitos antinociceptivos do extrato e do ácido fumarprotocetrárico poderia ser devido a suas propriedades antiinflamatórias. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de que os compostos estudados apresentem efeitos espasmolíticos, o que seria responsável, em parte, pela diminuição do número de "writhings" exibidos (VALENCIA et al., 1994).

A ação antiinflamatória do extrato acetônico foi avaliada em diferentes modelos experimentais de inflamação aguda, subcrônica e crônica.

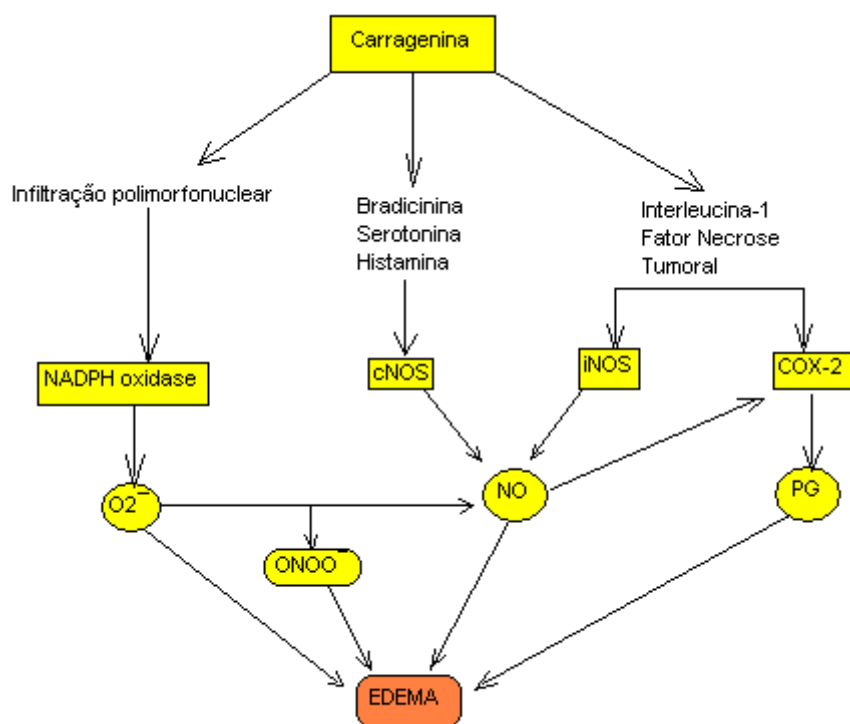
O edema de pata induzido por carragenina é um modelo de inflamação aguda que envolve uma resposta complexa e gradual na qual a infiltração de proteínas plasmáticas, aparecimento de atividade quimiotática e acumulação de neutrófilos estão intimamente relacionados (LO et al., 1981).

A formação do edema de pata induzido por carragenina ocorre em duas fases distintas. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção do

irritante. O desenvolvimento é então acelerado rapidamente e estabiliza-se entre 20 e 60 minutos. O desenvolvimento da segunda fase inicia-se uma (01) hora após a injeção do irritante e acelera rapidamente até estabilizar-se em torno da terceira hora (VINEGAR et al., 1976).

Diversos mediadores químicos da inflamação estão envolvidos neste modelo como histamina, bradicinina, serotonina e prostaglandinas). Estes mediadores são liberados em momentos diferentes (Di ROSA et al., 1971): na primeira hora, histamina e serotonina são os principais mediadores; na segunda, as cininas são predominantes e na terceira hora, as prostaglandinas têm um papel principal no edema agudo, enquanto o sistema complemento atua durante todo o processo.

Segundo SALVEMINI et al. (1996), existe também uma inter-relação proposta entre NO, prostaglandinas e radicais livres derivados de oxigênio neste modelo de inflamação. Assim, durante a primeira e segunda hora, o edema é induzido pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina. Estes mediadores ativam a enzima constitutiva cNOS, resultando na liberação de NO. Conforme a resposta inflamatória prossegue, a enzima iNOS é induzida e gera maiores quantidades de NO que parece manter o edema na fase de pico (em torno da terceira hora). Os caminhos da COX e NOS aparentemente operam juntos para amplificar a resposta inflamatória, já que NO ativa a COX-1 e COX-2, resultando em uma produção aumentada de prostaglandinas.



Fonte: SALVEMINI et al., 1996

FIGURA 13 - Inter-relação entre óxido nítrico, prostaglandinas e radicais livres derivados de oxigênio no edema de pata induzido por carragenina.

A infiltração neutrofílica em resposta à carragenina e a ativação da NADPH oxidase gera radicais livres de oxigênio como O_2^- que promovem peroxidação lipídica, aumentam a permeabilidade vascular, estimulam o recrutamento celular e produzem dano tecidual. Além disso, a geração de O_2^- na presença de NO forma o radical citotóxico $ONOO^-$ que pode ser responsável, em parte, pelo dano tecidual presente neste modelo de inflamação aguda (BECKMAN et al., 1990).

Sabe-se que a indometacina atua neste modelo de inflamação de diversas formas, inibindo a síntese de prostaglandinas e a infiltração de proteínas plasmáticas e neutrófilos no sítio inflamatório (LO et al., 1982).

De acordo com os resultados obtidos, possivelmente o extrato acetônico interfere em diferentes mediadores da inflamação, tendo em vista a redução significativa do edema em diferentes intervalos de tempo, 30 min (20,18%) e aos 180 minutos (28,85 %).

SILVA (1998), estudando diferentes extratos orgânicos de *Cladina dendroides*, encontrou percentuais distintos de inibição do edema de pata induzido por carragenina em camundongos machos (50% com o extrato etéreo e 34,2% com os extratos clorofórmico e acetônico), sugerindo que essas diferenças poderiam ser devidas a influências de outros compostos presentes nos extratos, além da atranorina, a substância presente em maior concentração.

A inibição da evolução do edema provocada pelo extrato acetônico de *C. verticillaris* nos primeiros 30 minutos sugere a possibilidade de substâncias presentes no extrato interferirem na ação ou liberação da serotonina e/ou histamina uma vez que esses mediadores predominam na fase inicial do edema de pata induzido por carragenina (SANTOS et al., 2000).

Por outro lado, enzimas lisossômicas, que podem contribuir para o processo inflamatório, são também liberadas durante a fagocitose da carragenina (KAO et al., 1988). Já foi demonstrado que o mecanismo de ação de certos antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais envolve a estabilização das membranas lisossômicas nos neutrófilos de ratos, prevenindo a liberação das enzimas lisossômicas (CARVALHO, 1998). Nesse mesmo modelo de inflamação aguda, também já foram identificados agentes que atuam sobre o sistema complemento e causam uma inibição significativa do edema da pata (GIROUD et al., 1970). Estes poderiam ser outros mecanismos de ação que justificassem o efeito antiinflamatório do extrato acetônico na primeira hora do desenvolvimento do edema.

Sabe-se que compostos que possuem efeito depressor sobre o sistema nervoso central (anestésicos gerais e analgésicos narcóticos) têm mostrado atividade antiinflamatória em ratos (GRISWOLD et al., 1982). No entanto, o extrato acetônico não mostrou efeito na dor induzida pelo calor no teste da placa quente, diferente do analgésico de ação central morfina (ENGELHARDT et al., 1995). Isto indica que o composto estudado não apresenta ação analgésica central e, portanto, sua atividade antiinflamatória não estaria relacionada com um efeito depressor sobre o sistema nervoso central.

A inibição do edema de pata induzido por carragenina aos 180 minutos coincide com o pico do edema, indução da COX-2 (SIEBERT et al., 1994) e a liberação de prostaglandinas, sugerindo o envolvimento do extrato com o metabolismo do ácido araquidônico. No entanto, há a possibilidade do extrato estar agindo também por inibição da enzima NOS, o que, de acordo com SALVEMINI et

al. (1996), resulta em diminuição da infiltração neutrofílica no sítio da inflamação, diminuição da produção de prostaglandinas, óxido nítrico e peroxinitrito.

As considerações acima, embora pertinentes, não permitem apontar o mecanismo exato através do qual o composto exerce sua atividade antiedematogênica nesse modelo de inflamação. No entanto, indicam uma perspectiva de estudos posteriores para aprofundamento do mecanismo de ação da droga.

A atividade de compostos sobre o edema de pata induzido pela dextrana envolve a degranulação de mastócitos, com conseqüente liberação de histamina, importante mediador inflamatório, agindo em dois receptores histaminérgicos: H1 e H2 (LO et al., 1982; GARRISON, 1991). A resposta inflamatória desenvolvida em presença do dextran aparenta ser uma mistura de dois tipos de respostas: uma imediata que corresponde à transudação de fluido pobre em proteínas, e uma tardia que corresponde à infiltração de proteínas e neutrófilos (LO et al., 1982).

O edema induzido por dextran é inibido pela clorpromazina (anti-histamínicos) e por alguns agentes adrenérgicos, mas não pela cortisona. Ele é também discretamente inibido na presença de altas doses de fenilbutazona (WINTER et al., 1962).

O maleato de dexclorfeniramina, uma droga anti-histamínica usada como referência neste estudo, mostrou inibição significativa do volume da pata, similar ao extrato acetônico, a partir da primeira até a terceira hora. Os dados deste ensaio, somados aos já obtidos no modelo de inflamação por carragenina, sugerem que o extrato acetônico pode ser útil em condições inflamatórias que envolvem a histamina.

Ainda com relação aos modelos experimentais de inflamação aguda, foi utilizado o edema de pata induzido por zimosan para avaliar a atividade antiedematogênica do ácido fumarprotocetrárico isolado de *C. verticillaris*. O zimosan é um polissacarídeo constituinte da parede celular de leveduras usado para gerar uma resposta inflamatória quando injetado na área subplantar da pata traseira do rato (GADO & GIGLER, 1991).

A resposta inflamatória no edema de pata induzido por zimosan é o resultado de uma cascata de eventos que incluem a ativação o sistema do complemento (WILLIAMS et al., 1981), degranulação de mastócitos (KONNO et al.,

1985) e geração de metabólitos da 5-lipoxigenase e da ciclooxygenase (RAO et al., 1994; GRIFFITHS et al., 1991).

De acordo com VIANA et al. (1998), o edema de pata induzido por zimosan é sensível aos antagonistas da histamina e serotonina e drogas inibidoras da lipooxygenase, mas pouco sensível a compostos que possuem apenas atividade inibitória da ciclooxygenase. Neste estudo, um inibidor da ciclooxygenase (indometacina) foi utilizado como referência e inibiu a formação do edema em todos os tempos registrados. A explicação para esse fato pode ser por uma ação da droga sobre o influxo celular, pois os polimorfonucleares (PMN) têm um papel central nas manifestações vasculares que acontecem neste modelo de inflamação (RAO et al., 1994). Em adição aos fatores quimiotáticos clássicos como LTB₄, ácidos hidroieicosanóicos e fragmentos do complemento, outras substâncias também regulam o influxo de neutrófilos *in vivo*, como as citocinas (TNF- α) e interleucinas-1 e IL-8 (DINARELLO, 1996; LUSTER, 1998). Interferência farmacológica com qualquer um desses mediadores poderia resultar em um influxo celular alterado.

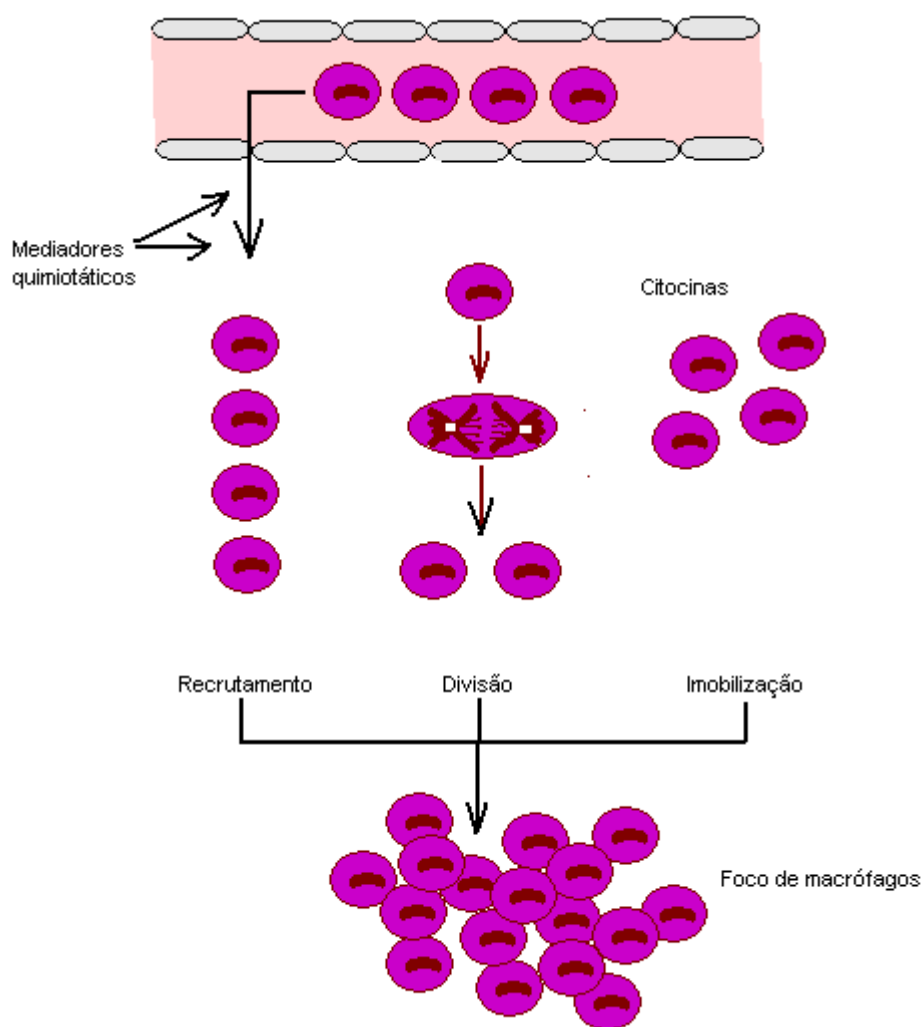
O ácido fumarprotocetrárico inibiu o edema induzido por zimosan em todos os tempos do experimento. As características desse tipo de inflamação aguda sugerem que o efeito apresentado pelo composto em estudo pode ser devido ao bloqueio da atividade de fatores quimiotáticos, ou por bloqueio da ação da serotonina, histamina e da enzima lipooxygenase.

A lesão granulomatosa induzida por “pellets” de algodão é um modelo de inflamação subcrônica indicativa da fase proliferativa da inflamação. De acordo com COLLINS (2000), a inflamação granulomatosa é um tipo específico de inflamação desencadeada por uma variedade de agentes infecciosos e não-infecciosos. Um granuloma é uma área focal de inflamação granulomatosa e consiste em uma agregação de macrófagos que estão transformados em células de aparência epitelial (epitelióide), circundadas por leucócitos mononucleares, principalmente linfócitos.

O extrato acetônico não mostrou atividade sobre este modelo de inflamação. Este resultado sugere ausência de atividade do extrato sobre os fenômenos de aporte e proliferação de células inflamatórias nessa fase do processo inflamatório.

Estudos adicionais com diferentes doses, ou modificações na frequência de administração são necessários para confirmar ou contestar essa ausência de efeito do extrato acetônico frente à inflamação subcrônica.

Na inflamação crônica, o acúmulo de macrófagos persiste devido a diferentes mecanismos (Figura 14): recrutamento contínuo de monócitos circulantes e aumento da adesão através da expressão constante de moléculas de aderência e fatores quimiotáticos; proliferação local dos macrófagos após o extravasamento da corrente sanguínea e imobilização dos mesmos no local de inflamação por citocinas e lipídios oxidados (STEINBERG, 1997; LLUSCINSKAS et al., 1996). A interferência em qualquer desses mecanismos pode afetar o desenvolvimento da inflamação.



Fonte: COLLINS, 2000.

FIGURA 14 - Mecanismos que permitem o acúmulo de macrófagos no sítio de inflamação crônica.

O extrato reduziu o edema de pata induzido por formaldeído, do segundo ao décimo dia, sugerindo o uso do extrato acetônico em condições inflamatórias crônicas, porém o mecanismo de ação pelo qual o efeito antiinflamatório se produziu não pode ser aqui especificado. Essa ação poderia estar relacionada a um ou mais mecanismos que permitem o acúmulo de macrófagos no sítio de inflamação crônica.

Muitos estudos têm mostrado que os agentes antiinflamatórios mais comuns causam danos à mucosa gástrica, consistindo principalmente de hemorragias, erosões e úlceras (LANZA, 1981). Estes danos são presumidamente produzidos pela inibição da via da ciclooxygenase-1 (COX-1), necessária para a síntese de prostaglandinas que são responsáveis por muitos mecanismos normais de defesa da mucosa gástrica como a produção de muco, secreção de bicarbonato e inibição da produção de ácido (LANZA, 1993).

O desenvolvimento de inibidores da ciclooxygenase-2 (COX-2) como potencialmente mais seguros para a mucosa do trato gastrointestinal é baseado na noção de que a COX-1 predomina no estômago, dando origem às prostaglandinas protetoras, enquanto a COX-2 é induzida na inflamação, dando origem à dor e edema (HAWKEY, 1999).

A observação macroscópica da mucosa gástrica é útil para observar o efeito ulcerogênico de uma droga (THUILLIER et al., 1968). Os estômagos dos animais tratados de forma aguda e crônica com o extrato acetônico e observados macroscopicamente neste estudo não mostraram lesões, demonstrando a boa tolerância gastrointestinal do extrato acetônico.

O extrato e o ácido fumarprotocetrárico isolado inibiram a febre induzida por lipopolissacarídeo aos 30 e 60 minutos após a injeção de LPS, com resultados semelhantes ao grupo tratado com paracetamol. No caso do extrato bruto, o resultado pode ser considerado ainda mais relevante, visto que o ácido fumarprotocetrárico provavelmente está em concentração ainda mais baixa quando comparado à substância purificada. Isto pode indicar a presença de mais de um composto ativo no extrato de *C. verticillaris*.

A injeção de LPS tem mostrado estimular a produção endógena de TNF- α e induzir uma febre bifásica em cobaias e ratos (KLUGER, 1991). No entanto, neste trabalho, a injeção de LPS produziu uma febre monofásica, atingindo um aumento máximo da temperatura corporal aos 60 minutos após a injeção de LPS.

Dados na literatura sobre o mecanismo da febre bifásica induzida pela injeção de LPS não são muito claros; parece ser espécie-específico e altamente influenciado pela dose de LPS empregado (SANTOS et al., 1998).

A febre induzida por LPS está relacionada com a produção endógena de TNF- α e interleucinas (KLUGER, 1991). A injeção periférica de LPS estimula a produção não somente destas citocinas, mas também outros mediadores endógenos que estão envolvidos na febre como o NO, CO e prostaglandinas E2 (ROTH et al., 2001). A formação de Prostaglandinas E2 depende da atividade da ciclooxigenase, que existe em duas isoformas, a constitutiva COX-1 e a induzida COX-2. A indução de COX-2, medida pela expressão de RNAm ou de proteína após a injeção de LPS pode ser demonstrada em tecidos neurais (CAO et al., 1995).

MILTON & WENDLANDT (1971) foram provavelmente os primeiros a propor que os pirogênicos poderiam induzir febre através da produção de prostaglandinas e que as drogas antipiréticas do tipo AINEs reduzem o processo através do bloqueio da ciclooxigenase, responsável pela biossíntese das prostaglandinas. Por outro lado, existem evidências que suportam a hipótese de que pelo menos parte da ação antipirética dos AINEs deve ser devida ao aumento na liberação de arginina-vasopressina (AVP) ou do hormônio melanotrófico (α -MSH) – (ALEXANDER et al., 1989).

Considerando que o extrato acetônico e o ácido fumarprotocetrárico também apresentaram resultados positivos em relação aos modelos experimentais de inflamação aguda e crônica, a inibição da resposta febril pelos compostos poderia ser devido a um bloqueio da síntese de prostaglandinas.

7 CONCLUSÕES

1. O extrato acetônico de *Cladonia verticillaris* mostrou baixa ordem de toxicidade por via oral, proporcionando uma boa margem de segurança em doses terapêuticas.
2. Os resultados obtidos no teste de “writhing” demonstraram que o extrato acetônico e o ácido fumarprotocetrárico isolado possuem ação analgésica e que parte dos efeitos antinociceptivos poderia ser devido a suas propriedades antiinflamatórias.
3. O extrato acetônico de *C. verticillaris* exibiu atividade anti-edematogênica frente aos modelos experimentais de inflamação aguda (edema de pata induzido por carragenina e dextran), em diferentes intervalos de tempo, sugerindo a ação sobre diferentes mediadores inflamatórios.
4. O ácido fumarprotocetrárico isolado de *C. verticillaris* exibiu atividade anti-edematogênica frente ao modelo experimental de inflamação aguda (edema de pata induzido por zimosan) em todos os tempos do experimento sugerindo a ação sobre os principais mediadores envolvidos neste modelo de inflamação.
5. O extrato acetônico não inibiu a formação de granulomas na lesão granulomatosa induzida por “pellets” de algodão, sugerindo ausência de atividade sobre os fenômenos de aporte e proliferação de células inflamatórias nessa fase do processo inflamatório.
6. O extrato acetônico exibiu atividade no modelo experimental de inflamação crônica (artrite induzida por formaldeído), sugerindo a ação sobre os mecanismos que permitem o acúmulo de macrófagos no sítio inflamatório.
7. Os estômagos dos animais tratados de forma aguda e crônica com o extrato acetônico não mostraram lesões, demonstrando a boa tolerância gastrointestinal do mesmo.

8. O extrato acetônico não apresentou ação analgésica central e, portanto, suas atividades analgésicas e antiinflamatórias não estariam relacionadas com um efeito depressor sobre o sistema nervoso central.

9. O extrato acetônico e o ácido fumarprotocetrárico demonstraram atividade antipirética e a mesma poderia estar relacionada com o bloqueio da síntese de prostaglandinas, considerando que os compostos apresentaram resultados positivos em relação aos modelos experimentais de inflamação aguda e crônica.

Os dados apresentados abrem perspectivas a estudos para elucidar mecanismos de ação do ácido fumarprotocetrárico e atranorina, bem como sua ação sinérgica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOURIDAKIS, P. et al. The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. **Respir. Res.**, v.3, p.25, 2002.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER-FILHO, L. The lichen family cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brasil. **Tropical Briology**, v.7, p.55-70, 1993.
- ALEXANDER, S. J.; COOPER, K. E.; VEALE, W. L. Sodium salicylate: alternate mechanism of central antipyretic action in the rat. **Pluegers Arch.**, v.413, p.451-455, 1989.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. **Introductory Micology**. New York: J. Wiley, 1979. 632 p.
- ARNOULD, T. et al. PGF_{2α}, a prostanoid released by endothelial cells activated by hypoxia, is a chemoattractant candidate for neutrophil recruitment. **Am. J. Path.**, v.159, p.345-357, 2001.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. **Chemistry of lichens substances**. Tokyo: Society for the Promotion of Science, 1954. 20p.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines -- CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.**, v.55, p.97-179, 1994.
- BARMAN, S. A. Pulmonary vasoreactivity to serotonin during hypoxia is modulated by ATP-sensitive potassium channels. **Journal of Applied Physiology**, v.83, p.569-574, 1997.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol Today**, V.15, P.74-80, 1994.
- BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, T. W. et al. Apparent hydroxyl xynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.87, p.1620-1624, 1990.
- BENVENISTE, J.; HENSON, P. M.; COCHRANE, C. G. Leukocyte dependent histamine release from rabbit platelets: The role of IgE, basophils and a platelet activating factor. **J. Exp. Med.**, v.136, p.1356-1460, 1972.
- BEUTLER, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. **J. Invest. Med.**, v.43, p.227-235, 1995.
- BHoola, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, v.44, p.1-80, 1992.

- BINDSEIL, K. U. et al. Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. **Drug Discov. Today**, v.16, p.840-847, 2001.
- BIZIOS, R. et al. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. **J. Cell. Physiol.**, v.128, p.485-490, 1986.
- BJORLING, D. E.; SABAN, M. R.; SABAN, R. Neurogenic inflammation of the guinea pig bladder. **Med. Inflamm.**, V.3, P.189-197, 1994.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, V.89, P.3503-3521, 1997.
- BOZIC, C. R. et al. Neurogenic amplification of immune complex inflammation. **Science**, v.273, p.1722-1725, 1996.
- CALDWELL, J. R. et al. Sucralfate treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal symptoms and mucosal damage. **Am. J. Med.**, v.83, p.74-82, 1987.
- CAMPANELLA, L. et al. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, v.84, p.329-334, 2002.
- CAO, C. et al. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. **Brain Research**, v.697, p.187-196, 1995.
- CARVALHO, W. A. Analgésicos, Antipiréticos e antiinflamatórios. In: SILVA, P. (Ed.). **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.386-407.
- CASTILLO, S. S.; ABSALÓN, M. A. H. Antipiresis aguda con una nueva asociación (naproxén sódico y acetaminofén) em padecimientos febriles. **Invest. Méd. Int.**, v.10, p.60-64, 1983.
- CHAHN, L. A., IGGO, A. The effects of bradykinin and prostaglandin E₁ on rat cutaneous afferent nerve activity. **Br. J. Pharmacol.**, v.59, p.343-347, 1977.
- CICALA, C.; CIRINO, G. Linkage between inflammation and coagulation: an update on the molecular basis of the crosstalk. **Life Sciences**, v.62, p.1817-1824, 1998.
- COCCHIETTO, M. et al. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v.4, p.137-46, 2002.
- COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Eds.). **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 44-78.
- COUPADE, C. et al. Cytokine Modulation of Liver Annexin 1 Expression during Experimental Endotoxemia. **American Journal of Pathology**, v.159, p.1435-1443, 2001.

- CROFFORD, L. J. et al. Thrombosis in patients with connective tissue diseases treated with specific cyclooxygenase-2 inhibitors: a report of four cases. **Arthritis Rheum.**, v.43, p.1891-1896, 2000.
- CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer-chromatographic method. **J. Chromatog.**, v.72, p.113-125, 1972.
- DAHLEN, S. E.; SERHAN, C. N. Lipoxins: bioactive lipoxigenase interaction products. In: WONG, A. & CROOKE, S. T. (Eds.). **Lipoxygenases and their products**. San Diego: Academic press, 1991.
- Di ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Path.**, v.104, p.15-29, 1971.
- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v.87, p.2095-2147, 1996.
- DINCHUK, J. E. et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. **Nature**, v.378, p.406-409, 1995.
- DOUNI, E. et al. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. **J. Inflamm.**, v.47, p.27-38, 1995.
- EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutinyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.107, p.385-393, 1959.
- EHSANULLAH, R. S. B. et al. Prevention of gastrointestinal damage induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs: controlled trial of ranitidine. **BMJ**, v.297, p.1017-1021, 1988.
- ENGELHARDT, G. et al. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. **Inflamm. Res.**, v.44, p.423-433, 1995.
- ERSPAMER, V.; ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. **Nature**, v.169, p.800-801, 1952.
- ESMON, C. T.; TAYLOR JR, F. B.; SNOW, R. Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. **Thromb. Hemost.**, v.66, p.160-165, 1991.
- FACULDADE DE ODONTOLOGIA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Laboratório de Informática dedicado à Odontologia. Patoartegeral. Disponível em <<http://usp.br/fo/lido/patoartegeral/patoarteinfl.htm>>. Acesso em 15 out.2002.

- FELDMANN, M. et al. Cytokine blockade in rheumatoid arthritis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.490, p.119-127, 2001.
- FIERRO, J. M.; SERHAN, C. N. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.555-566, 2001.
- FIGUEROA, C. D.; McIVER, A. G.; BHOOLA, K. D. Identification of a tissue kallikrein in human polymorphonuclear leucocytes. **Br. J. Haematol.**, v.72, p.321-328, 1989.
- FITZGERALD, G. A. et al. Estimated rate of prostacyclin secretion into the circulation of normal man. **J. Clin. Invest.**, vol.68, p.1272-1275, 1981.
- FITZGERALD, G. A. et al. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. **N. Engl. J. Med.**, v.310, p.1065-1068, 1984.
- FREED, M. S.; NEEDELMAN, P.; DUNKEL, C. G.; SAFFITZ, J. E.; EVERS, A. S. Role of invading leukocytes in enhanced atrial eicosanoid production following rabbit left ventricular myocardial infarction. **J. Clin. Invest.**, v.83, p.205-212, 1999.
- GADÓ, K.; GIGLER, G. Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new anti-inflammatory drugs. **Agents and Actions**, v.32, p.119, 1991.
- GARRISON, J. C. Histamina, bradicinina, 5-hidroxitriptamina e seus antagonistas. In: GILMAN, A. G. (Ed.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.378-394.
- GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. The interrelations of complement and a prostaglandin-like substance in acute inflammation. **J. Path.**, v.101, p.241, 1970.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.450-479.
- GRAFF, L. et al. Expression of histidine decarboxylase and synthesis of histamine by human small cell lung carcinoma. **American Journal of Pathology**, v.160, p.1561-1565, 2002.
- GRAHAM, D. Y. et al. Duodenal and gastric ulcer prevention with misoprostol in arthritis patients taking NSAIDs. **Ann. Intern. Med.**, v.119, p.257-262, 1993.
- GRIFFITHS, R. J. et al. A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicine in a model of zymosan induced inflammation in the rat knee joint and peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v.32, p.312, 1991.
- GRISWOLD, D. E. et al. Inhibition of carrageenan-induced inflammation by urethane anaesthesia in adrenalectomized and sham operated rats. **J. Pharmacol. Methods**, v.8, p.161-164, 1982.

- HALE Jr., M. E. **The Biology of Lichens**. 3rd ed. London: Edward Arnold, 1983. 90p.
- HANDWERKER, H. O. Influences of algogenic substances and prostaglandins on the discharges of unmyelinated cutaneous nerve fibers identified as nociceptors. **Adv. Pain Res. Therapy**, v.1, p.41-45, 1976.
- HAWKEY, C. J. Cox-2 inhibitors. **The Lancet**, v.353, p.307-14, 1999.
- HOECK, W. G.; RAMESHA, C. S. et al. Cytoplasmic phospholipase A₂ activity and gene expression are stimulated by tumour necrosis factor: dexamethasone blocks the induced synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.4475-4479, 1993.
- HOLGATE, S. T. Acute and chronic inflammatory mechanisms in asthma. **Br. J. Clin. Pract.**, v.81, p.11-13, 1995.
- HORNIG, D.; DREXLER, H. Endothelial function and bradykinin in humans. **Drugs**, v.54, p.S42-S47, 1997.
- IMHOF, B. A.; DUNON, D. Leukocyte migration and adhesion. **Adv. Immunol.**, v.58, p.345-416, 1995.
- INGOLFSDOTTIR, K. et al. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.6, p.141-144, 1998.
- IÑIGUEZ, M. A.; PUNZÓN, C.; FRESNO, M. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. **The Journal of Immunology**, v.163, p.111-119, 1999.
- ISSEKUTZ, A. C.; MOVAT, H. Z. The effect of vasodilator prostaglandins on polymorphonuclear leukocyte infiltration and vascular injury. **American Journal of Pathology**, v.107, p.300-309, 1982.
- JAAKKOLA, K.; NIKULA, T. et al. *In vivo* detection of vascular adhesion protein-1 in experimental inflammation. **The American Journal of Pathology**, v.157, p.463-471, 2000.
- JOHNSON, R. J. et al. New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.1379-1387, 1987.
- KAJITA, T.; HUGLI, T. E. C5a-induced neutrophilia—a primary humoral mechanism for recruitment of neutrophils. **Am. J. Pathol.**, v.137, p.467-477, 1990.
- KAMINSKI, D. L. et al. The role of prostanoids in the production of acute acalculous cholecystitis by platelet-activating factor. **Ann. Surg.**, v.212, p.455-461, 1990.
- KAO, R. C. et al. Proteinase 3: a distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. **J. Clin. Invest.**, v.82, p.1963-1973, 1988.

- KESSLER, W. et al. Excitation of cutaneous afferent nerve endings in vitro by a combination of inflammatory mediators and conditioning effect of substance P. **Exp. Brain Res.**, v.91, p.467-476, 1992.
- KILGORE, K. S. et al. The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. **Cardiovasc. Res.**, v.28, p.437-444, 1994.
- KIM, F. J. et al. Reperfused gut elaborates PAF that chemoattracts and primes neutrophils. **J. Surg. Res.**, v.58, p.636-640, 1995.
- KLEIN, T. et al. Selective inhibition of cyclooxygenase 2. **Biochemical Pharmacology**, v.48, p.1605-1610, 1994.
- KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol. Rev.**, v.71, p.93-127, 1991.
- KONNO, S.; TSURUFUJI, S. Analysis of the factor(s) involved in pathogenesis of zimosan-induced inflammation in rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, v.38, p.177-184, 1985.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; De BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v.18, p.412, 1959.
- KUJUBO, D. A.; HERSCHMAN, H. R. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the T1S10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.7991-7994, 1992.
- KUMAR, K. C.; MULLER, K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. **J. Nat. Prod.**, v.62, p.821-823, 1999.
- LAGUNOFF, D. Structural aspects of histamine binding: the mast cell granule. In: VON EULER, U. S.; ROSELL, S.; UYNAS, B. (Eds.). **Mechanisms of Release of Biogenic Amines**. New York: Pergamon, 1966. p.79-94.
- LANDER, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **FASEB J.**, V.11, P.118-124, 1997.
- LANDER, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **FASEB J.**, v.11, p.887-901, 1990.
- LANG, E.; NOVAK, A. et al. Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. **J. Neurophysiol.**, V.63, P.887-901, 1990.
- LANZA, F. L. et al. A comparative endoscopic evaluation of the damaging effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on the gastric and duodenal mucosa. **Am. J. Gastroenterol.**, v.75, p.17-22, 1981.
- LANZA, F. L. Gastrointestinal toxicity of newer NSAIDs. **The American Journal of Gastroenterology**, V.88, P.1318-1323, 1993.

- LANZA, F. L. Gastrointestinal toxicity of newer NSAIDs. **The American Journal of Gastroenterology**, v.88, p.1318-1323, 1993.
- LAUTERWEIN, M. et al. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)- usnic acid and (-)- usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, p.2541-2543, 1995.
- LEE, S. H. et al. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.25934-25938, 1992.
- LEGAZ, M. E. et al. Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. **Byochem. Syst. Ecol.**, v.14, p.575-582, 1986.
- LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant. Physiol.**, n.71, p.300-302, 1983.
- LEME, J. G.; OLIVEIRA, J. C. R.; SANNOMIYA, P. Drogas antiinflamatórias. In: SILVA, P. (Ed.). **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.507-520.
- LEWIS, M. S. et al. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. **J. Clin. Invest.**, v. 82, p.2045-2055, 1988.
- LLUSCINSKAS, F. W.; GIMBRONE, M. A. Jr. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. **Annu. Rev. Med.**, v.47, p.413-421, 1996.
- LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Indomethacin inhibits increased vascular permeability after intrapleural injection of carrageenan into rat but does not impair generation of neutrophil chemotactic factor(s). **Fed. Proc.**, v.50, p.1637, 1981.
- LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v.221, p.261-267, 1982.
- LORKE, D. A new approach to practical acute toxicity testing. **Arch. Toxicol.**, v.54, p.275-287, 1993.
- LU, B. et al. The control of microvascular permeability and blood pressure by neutral endopeptidase. **Nat. Med.**, v.3, p.904-907, 1997.
- LUM, H.; MALIK, A. B. Regulation of vascular endothelial barrier function. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, V. 267, p.L223-L241, 1994.
- LUM, H.; ROEBUCK, K. A. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.280, p.719-741, 2001.

- LUSTER, A. D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.**, V.338, P.436-445, 1998.
- LUSTER, A. D.; ROTHENBERG, M. E. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. **J. Leuk. Biol.**, v.62, p.620-633, 1997.
- MAIA, M. B. S. et al. Antinociceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from the lichen *Cladina dendroides* (des Abb.) Ahti. **Acta Farm. Bonaerense**, v.4, p.259-264, 2002.
- MAIA, M. B. S.; RAO, V. S. Anti-inflammatory activity of *Orbignia phalerata* in rats. **Phytoterapy research.**, v.3, p.170-174, 1989.
- MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies of inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopy study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, V.11, P.571-605, 1961.
- MAJNO, G.; PALADE, G. E.; SCHOEFL, G. Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, V.11, P.607-626, 1961.
- MAJNO, G.; SHEA, S. M.; LEVENTHAL, M. Endothelial contraction induced by histamine type mediators. **J. Cell Biol.**, V.42, P.647-672, 1969.
- MARKS, R. M.; TODD, R. F.; WARD, P. A. Rapid induction of neutrophil-endothelial adhesion by endothelial complement fixation. **Nature**, V.339, P.314-317, 1989.
- Mc ADAM et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.5890, 1999.
- Mc CARTHY, C. J. et al. Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Gastroenterol.**, v.94, p.1218-1223, 1999.
- Mc NAMARA, C. A. et al. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. **J. Clin. Invest.**, v.91, p.94-98, 1993.
- MEUER, S.; ECKER, U.; HADDING, U.; BITTER-SUERMAN, D. Platelet-serotonin release by C3a and C5a: two independent pathways of activation. **J. Immunol.**, v.126, p.1506-1509, 1981.
- MICHEL, C. C.; KENDALL, S. Differing effects of histamine and serotonin on microvascular permeability in anaesthetized rats. **J. Physiol.**, V.501, P.657-662, 1997.

- MILLER, L. C. & TAINTER, M. L. Estimation of ED50 and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.57, p.261-264, 1944.
- MILTON, A. S.; WENDLANDT, S. Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E, and F series on injection into the third ventricle of anaesthetized cats and rabbits. **J. Physiol. Lond.**, v.218, p.325-336, 1971.
- MIZUMURA, K.; SATO, J.; KUMAZAWA, T. Effects of prostaglandins and other putative chemical intermediaries on the activity of canine testicular polymodal receptors studied *in vitro*. **Pflugers Arch.**, V.408, P.565-572, 1987.
- MIZUNO, H. et al. Induction of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. **Gastroenterology.**, v.112, p.1218-1223, 1997.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.**, V.9, P.1319-1330, 1995.
- MORGAN, B. P. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, V.32, P.265-298, 1995.
- MOXLEY, G.; RUDDY, S. Immune complexes and complement. In: KELLEY, W. N. et al. (Eds.). **Textbook of Rheumatology** 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1997.p. 228-240.
- MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.56, p.9-16, 2001.
- MYERS, S. I. et al. Platelet activating factor (PAF) stimulates release of PGI₂ from inflamed rabbit gallbladder cell cultures. **Prostaglandins**, v.50, p.19-31, 1995.
- NANTEL, F. et al. Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. **FEBS Lett.**, v.457, p.475-477, 1999.
- NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase. **J. Clin. Invest.**, v.100, p.2417, 1997.
- OHBA, T. et al. Thrombin in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis mediates proliferation of synovial fibroblast-like cells by induction of platelet derived growth factor. **J. Rheumatol.**, v.23, p.1505-1511, 1996.
- OKA, T.; HORI, T. et al. Biphasic modulation in the trigeminal nociceptive neuronal responses by the intracerebroventricular prostaglandin E₂ may be mediated through different EP receptors subtypes in rats. **Brain Res.**, v.771, p.278-284, 1997.
- OLAFSDOTTIR, E. S.; INGOLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. **Planta Med.**, v.67, p.199-208, 2001.

- OYVIN, I. A. et al. Mechanism of blood vessel permeability derangement under the influence of permeability factors (histamine, serotonin, kinins) and inflammatory agents. **Biochem. Pharmacol.**, v.21, p.89-95, 1972.
- PATRONO, C.; DUNN, M. J. The clinical significance of inhibition of renal prostaglandin synthesis. **Kidney Int.**, v.32, p.1-12, 1987.
- PEREIRA, E. C. **Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de *Cladonias* e *Cladina* (Líquén)**. 1989. 193f. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1989.
- PEREIRA, E. C. Lichens from Brazilian northeast (NE) – studies and applications. In: MARCELLI, M. P. & SEAWARD, M. R. D. (Eds.). **Lichenology in Latin America**. Grupo Latino Americano de Liqueólogos (GLAL). International Association for Lichenology (IAL)/CNPq/CETESB. Brasil, 1998.p.65-70.
- PEREIRA, E. C. et al. Production of lichen metabolites by immobilized cells of *Cladonia clathrata* Ahti & Xavier Filho. **Phyton**, v.39, p.79-89, 1999.
- PEREIRA, E. C. **Biologia de Líquens**. Apostila do curso oferecido pelo Depto. de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.
- PEROTTI, C. A. A. et al. Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, V.32, P.1381-1387, 1999.
- POBER, J. S.; COTRAN, R. S. Overview: the role of endothelial cells in inflammation. **Transplantation**, V.50, p.537, 1990.
- RAO, N. V. et al. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.9540-9548, 1991.
- RAO, T. S. et al. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **J. Pharm. Exp. Therap.**, v.269, p.917, 1994.
- REID, K. B. et al. Complement component C1 and the collectins: parallels between routes of acquired and innate immunity. **Immunol. Today**, v.19, p.56-59, 1998.
- REMICK, D. G. et al. CXC chemokine redundancy ensures local neutrophil recruitment during acute inflammation. **American Journal of Pathology**, v.159, p.1149-1157, 2001.
- RIBBONS, K. A. et al. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.280, p.1008-1115, 1997.
- RINALDO, J. E.; CHRISTMAN, J. W. Mechanisms and mediators of the adult respiratory distress syndrome. **Clin. Chest Med.**, v.11, p.621-32, 1990.

- ROTH, J.; SOUZA, G. E. P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, p.301-314, 2001.
- RUEFF, A.; DRAY, A. Sensitization of peripheral afferent fibers in the in vitro neonatal rat spinal cord-tail by bradykinin and prostaglandins. **Neurosci.**, v.54, p.527-535, 1993.
- SABAN, M. R. et al. The involvement of leukotrienes, TNF α , and the LFA1/ICAM-1 interaction in substance P-induced granulocyte infiltration. **J. Leuk. Biol.**, v.61, p.445-451, 1997.
- SALMI, M.; RAJALA, P.; JALKANEN, S. Homing of mucosal leukocytes to joints. **Journal of Clinical Investigations**, v.99, p.2165-2172, 1997.
- SALVEMINI, D.; MISKO, T. P.; et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.7240-7244, 1993.
- SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Brit. J. Pharmacol.**, v.118, p.829-838, 1996.
- SALVEMINI, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, v.53, p.576-582, 1997.
- SANTOS, N. P. **Estudo Comparativo da Ação Antitumoral dos Extratos e Frações Purificadas de *Cladonia verticillaris* (líquen) contra Diferentes Tumores Sólidos Experimentais**. Recife, 1996. 117f. Tese de Mestrado – Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.
- SANTOS, N. P. et al. Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *C. verticillaris* (Líquen). **REV. UA. Série Ciências Biológicas**, v.1, n.2, p.23-43, 1996.
- SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. A study of the anti-pyretic effect of quinine, an alkaloid effective against cerebral malaria, on fever induced by bacterial endotoxin and yeast in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.50, p.225-229, 1998.
- SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytother. Res.**, v.14, p.240-244, 2000.
- SAUER, S. K.; SCHAFER, D.; KRESS, M.; REEH, P. W. Stimulated prostaglandin E₂ release from rat skin in vitro. **Life Sciences**, v.62, p.2045-2055, 1998.
- SEAWARD, M. R. D. Contribution of lichens to ecosystems. In: GALUN, M. (ed.). **CRC Handbook of Lichenology**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.107-109.

- SELYE, H. Further studies concerning the participation of the adrenal cortex in the pathogenesis of arthritis. **Br. Med. J.**, v.2, p.1129-1135, 1949.
- SERHAN, C. N. Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1212, p.1-25, 1994.
- SERHAN, C. N. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? **Prostaglandins**, v.53, p.107-137, 1997.
- SIEBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cicloxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.91, p.12013-12017, 1994.
- SILVA, E. F. **Atividades Antiinflamatória e Analgésica de Extratos Orgânicos e da Atranorina Purificada Obtidos de *Cladina dendroides* (Líquén)**. 1998. 66f. Tese de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.
- SILVA, A. A. R. **Avaliação Farmacológica do Efeito Antiinflamatório de Dois Derivados Tiazolidínicos: GS26 e GS28**. 2001. 65f. Tese de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.
- SPEER, B. R. **Introduction to Lichens: an alliance between kingdoms**. Disponível em <www.ucmp.berkeley.edu/fungi/lichens/lichens.html> Acesso em: 07 out. 2002.
- STEEN, K. H.; STEEN, A. E. et al. Inflammatory mediators potentiate pain induced in experimental tissue acidosis. **Pain**, v.66, p.163-170, 1996.
- STEINBERG, D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. **Circulation**, v.95, p.1062, 1997.
- STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. **J. Investig. Med.**, v.42, p.640-651, 1994.
- SULEYMAN, H. et al. An investigation of the anti-inflammatory effects of an extract from *Cladonia rangiformis* HOFFM. **Biol. Pharm. Bull.**, v.25, p.10-13, 2002.
- THOMSON, A. **The Cytokine Handbook**. London: Academic, 1991.
- THORLACIUS, H. et al. Microvascular mechanisms of histamine-induced potentiation of leukocyte adhesion evoked by chemoattractants. **Br. J. Pharmacol.** v. 116, p.3175-3180, 1995.
- THUILLIER, J.; BESSIN, P.; GEFFREY, F.; GODFRAID, J.J. Chimie et pharmacologie de la clofezone. **Chim. Therap.**, v.3, p.53-67, 1968.

- TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiol. Rev.**, v.79, p.1-71, 1999.
- VALENCIA, E. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of lapidin, a bicyclic sesquiterpene. **Planta Med.**, v.60, p.395-399, 1994.
- VANE, J. R. Mode of action of aspirin and similar compounds. In: ROBINSON, H. J.; VANE, J. R. (Eds.). **Prostaglandin Synthetase Inhibitors**. New York: Raven Press, 1974. p.155-164.
- VIANA, C. F. G. et al. Effects of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitoterapia**, v. LXIX, p.349-354, 1998.
- VICENTE, C. **Fisiologia de las substâncias liquênicas**. Madrid: Alhanbra, 1975, 162p.
- VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.; ARRUDA, E. C.; XAVIER-FILHO, L. Lichen phenols from *Cladonia dendroides* thalli. **Lichen Physiology and Biochemistry**, v.2, p.13-21, 1987.
- VINEGAR, R; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Quantitative Studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. **Fed. Proc.**, v.35, p.2447-2456, 1976.
- VOLIN, M. et al. Fractalkine: A Novel Angiogenic Chemokine in Rheumatoid Arthritis. **Am. J. Path.**, v.159, p.1521-1530, 2001.
- WALLACE, J. L. et al. Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. **Gastroenterology**, v.107, p.173-179, 1994.
- WASSERMAN, S. I. Mast cell-mediated inflammation in asthma. **Ann. Allergy**, v.63, p.546-550, 1989.
- WHITLLE, B. J. R. Mechanisms underlying gastric mucosal damage induced by indomethacin and bile salts, and the actions of prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, v.60, p.455-460, 1977.
- WILLIAMS, J. A.; SHACTER, E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E₂. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.25693-25699, 1997.
- WILLIAMS, T. J.; JOSE, P. J. Mediation of increased vascular permeability after complement activation. Histamine independent action of rabbit C5a. **J. Exp. Med.**, v.153, p.136-153, 1981.
- WILLIS, A. L. **Inflammation, Experimental Handbook of Pharmacology**. VANE, J. R. & FERREIRA, S. H. (Eds.). New York: Springer Verlag, 1978. p.138-189.

- WINTER, C. A.; PORTER, C. C. Effect of alterations in side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydrocorticosterone esters. **J. Amer. Pharm. Ass.**, v.46, p.515-519, 1957.
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.111, p.544-547, 1962.
- WISEMAN, E. H.; CHANG, Y. H. The role of fibrin in the inflammatory response to carrageenin. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v.159, p.206-209, 1968.
- WOLFE, M. M.; SOLL, A. H. The physiology of gastric acid secretion. **N. Engl. J. Med.**, v.319, p.1707-1715, 1988.
- XAVIER – FILHO, L. & RIZZINI, C. T. **Manual de Liquenologia Brasileiro**. Recife: UFPE, 1976, 431 p.
- XAVIER-FILHO, L. et al. Chemotaxonomical study on *Cladonia calycantha* and *Cladonia verticillaris*. – **Phyton**, v.44, p.121 – 124, 1984.
- YANG, J. J. et al. Internalization of Proteinase 3 Is Concomitant with Endothelial Cell Apoptosis and Internalization of Myeloperoxidase with Generation of Intracellular Oxidants. **American Journal of Pathology**, v.158, p.581-592, 2001.
- ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **Journal of Thermal Biology**, v.24, p.287-326, 1999.
- ZIMMERMANN, K. C. et al. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. **Mol. Pharmacol.**, v.54, p.536-540, 1998.