

GIANA MARINS COELHO

**EFEITO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO
DE *Psychotria nuda* (Cham & Schltl.) Wawra EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO DE PELE**

**PONTA GROSSA
2012**

GIANA MARINS COELHO

**EFEITO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO
DE *Psychotria nuda* (Cham & Schldl.) Wawra EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO DE PELE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Sinvaldo Baglie

Co-orientador: Prof. Dr. Michel F. Otuki

**PONTA GROSSA
2012**



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa



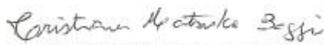
Ata nº. 12/2012

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA GIANA MARINS COELHO, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 28 DE MARÇO DE 2012, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

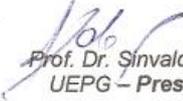
Aos vinte e oito dias do mês de março de dois mil e doze, às 10 h, na sala M-117, sob a presidência do Prof. Dr. Sinvaldo Baglie, em sessão pública, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Giana Marins Coelho, área de concentração: fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia, linha de pesquisa: avaliação clínico-laboratorial de processos fisiopatológicos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Sinvaldo Baglie/Presidente/UEPG, Profª. Drª. Cristiane Hatsuko Baggio/UFPR e Prof. Dr. Daniel Fernandes/UEPG, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi "Efeito do extrato bruto hidroalcoólico de *Psychotria nuda* (Cham & Schldl.) Wawra em modelos experimentais de inflamação de pele". Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido emitidos os seguintes conceitos: Prof. Dr. Sinvaldo Baglie (aprovada), Profª. Drª. Cristiane Hatsuko Baggio (aprovada) e Prof. Dr. Daniel Fernandes (aprovada), sendo a candidata "aprovada". Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UNICENTRO/UEPG, para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Nilva Giane Paulosi de Siqueira, estagiária do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG.

Ponta Grossa, 28 de março de 2012.

Observação (se necessária).


Profª. Drª. Cristiane Hatsuko Baggio
UFPR – 1ª. avaliadora


Prof. Dr. Daniel Fernandes
UEPG – 2ª. avaliador


Prof. Dr. Sinvaldo Baglie
UEPG – Presidente

Dedico este trabalho com muito respeito e carinho aos
meus pais, Geraldo e Sueli.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que com toda a sua misericórdia nos concede a graça de poder usufruir de sua criação todos os dias. Obrigada Senhor por ser meu guia em todos os momentos de minha vida.

Aos meus orientadores Sinvaldo Baglie e Michel Fleith Otuki, que através de seus conhecimentos me conduziram pelo caminho trilhado. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e dedicação.

Em especial a Daniel Augusto G. B. Mendes, por toda a dedicação na realização deste trabalho, sem sua ajuda tudo seria mais difícil.

Aos familiares, Geraldo, Sueli, Fernanda e André, por todo o carinho, compreensão e amor dedicados em todos estes anos.

Aos membros da banca examinadora Daniel Fernandes e Cristiane Hatsuko Baggio pela leitura e colaboração para a finalização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A bolsa de estudos concedida pela CAPES/CNPQ.

RESUMO

As doenças inflamatórias cutâneas acometem inúmeras pessoas no mundo e os tratamentos atuais, além de não solucionarem totalmente o problema, causam diversos efeitos indesejáveis. Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de novas terapias, as plantas podem representar um alvo em potencial para a descoberta de novos fármacos. A *Psychotria nuda* é uma espécie pertencente ao gênero *Psychotria* que não possui muitos estudos quanto a sua atividade biológica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato bruto hidroalcoólico 50% das folhas da *Psychotria nuda* (EBPN) no processo inflamatório da pele em modelos animais de inflamação aguda e crônica, induzidos pela aplicação tópica de óleo de cróton em camundongos Swiss fêmeas (15-35 g, N= 4-10). A aplicação tópica do EBPN inibiu de maneira dose-dependente o edema promovido por óleo de cróton com uma dose-efetiva 50% (DE₅₀) de $0,46 \pm 0,07$ mg/orelha, apresentando maior inibição com a dose de 1,0 mg/orelha ($71,6 \pm 1,3\%$). O tratamento tópico com EBPN inibiu significativamente a atividade da enzima MPO na pele; sendo que a maior inibição da atividade enzimática foi observada no grupo tratado com 1,0 mg/orelha do EBPN ($73,4 \pm 0,7\%$). A avaliação histológica também mostrou que o EBPN reduziu a migração celular em $37,0 \pm 2,1\%$. O EBPN foi ainda capaz de alterar os parâmetros inflamatórios no modelo de inflamação crônica induzida por múltipla aplicação de óleo de cróton inibindo o edema e reduzindo o aumento no peso das orelhas ($44,4 \pm 2,6\%$) e a atividade da MPO em $81,3 \pm 4,0\%$. Na análise histológica foi observado que o tratamento com EBPN reduziu a migração celular ($79,5 \pm 1,6\%$) e inibiu o aumento na espessura da epiderme ($52,6 \pm 3,2\%$). A imunomarcagem para Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) mostrou que o tratamento com EBPN foi capaz de reduzir o número de células em proliferação ($76,1 \pm 1,6\%$). Os resultados obtidos sugerem que o EBPN possui atividade anti-inflamatória por via tópica, visto que foi capaz de inibir o edema e a migração celular em processos inflamatórios na pele, assim como inibiu a hiperproliferação epidermal. Entretanto, são necessários mais estudos acerca desta atividade anti-inflamatória e a segurança, bem como elucidar o possível mecanismo de ação da *Psychotria nuda*.

Palavras-chave: *Psychotria nuda*. Inflamação. Pele.

ABSTRACT

The inflammatory skin diseases affect many people worldwide, and current treatments, do not solve the problem entirely, causing several undesirable effects. Given the need to develop new therapies, the plants may represent a potential target for drug discovery. The *Psychotria nuda* is a species of the genus *Psychotria* that does not have studies on its biological activity. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of crude extract of the leaves of *Psychotria nuda* (EBPN) in animal models of skin inflammation induced by topical application of croton oil in females mice (15-35g, N= 4-10). Topical application of EBPN inhibited in a dose-dependent edema promoted by croton oil with 50% effective dose (DE_{50}) of 0.46 ± 0.07 mg/ear, showing greater inhibition at a dose of 1.0 mg/ear ($71.6 \pm 1.3\%$). Topical treatment with EBPN significantly inhibited MPO enzyme activity in the skin, and the highest inhibition of the enzyme activity was observed in the group treated with 1.0 mg/ear EBPN ($73.4 \pm 0.7\%$). Histological evaluation also showed that EBPN reduced cell migration in $37.0 \pm 2.1\%$. The EBPN was still able to change the inflammatory parameters in the model of chronic inflammation induced by multiple application of croton oil inhibiting edema and reducing the increase in weight of ears ($44.4 \pm 2.6\%$) and MPO activity in $81.3 \pm 4.0\%$. Histological analysis was observed that treatment with EBPN reduced cell migration ($79.5 \pm 1.6\%$) and inhibited the increase in thickness of the epidermis ($52.6 \pm 3.2\%$). Immunostaining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) showed that treatment with EBPN was able to reduced the number of proliferating cells ($76.1 \pm 1.6\%$). These results suggest that EBPN present topical anti-inflammatory action, since it was able to inhibit edema and cell migration in inflammatory processes in the skin as well as reduced cellular proliferation. However, further studies are needed on this anti-inflammatory activity and safety, as well as elucidate the possible mechanism of action of *Psychotria nuda*.

Keywords: *Psychotria nuda*. Inflammation. Skin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do corte transversal da pele	13
Figura 2 -	Corte histológico e representação esquemática do corte transversal da epiderme	15
Figura 3 -	Foto das partes aéreas de <i>Psychotria nuda</i>	28
Figura 4A -	Efeito do EBPN no edema de orelha induzido pela aplicação aguda de óleo de cróton.....	37
Figura 4B -	Dose Efetiva 50% do EBPN no modelo de edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton.....	37
Figura 5 -	Efeito do EBPN sobre a atividade da enzima MPO no modelo de inflamação induzida pela aplicação aguda de óleo de cróton.....	38
Figura 6 -	Análise histológica de cortes transversais de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina após modelo de indução de inflamação aguda por óleo de cróton.....	40
Figura 7 -	Efeito do EBPN sobre o infiltrado celular induzido pela aplicação aguda de óleo de cróton.....	41
Figura 8 -	Efeito do EBPN no edema de orelha induzido pela múltipla aplicação de óleo de cróton	42
Figura 9 -	Efeito do EBPN sobre o peso das orelhas dos animais submetidos ao modelo de inflamação induzida pela múltipla aplicação de óleo de cróton.....	43

Figura 10 -	Efeito do EBPN na atividade da enzima MPO dos animais submetidos ao modelo de inflamação induzida pela múltipla aplicação de óleo de cróton.....	44
Figura 11 -	Efeito do EBPN na atividade da enzima NAG dos animais submetidos ao modelo de inflamação induzida pela múltipla aplicação de óleo de cróton.....	45
Figura 12 -	Análise histológica de cortes transversais de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina após modelo de indução de inflamação crônica por óleo de cróton.....	47
Figura 13 -	Efeito do EBPN sobre o infiltrado celular induzido pela múltipla aplicação tópica de óleo de cróton.....	48
Figura 14 -	Efeito do EBPN sobre a espessura da epiderme dos animais submetidos ao modelo de inflamação induzida pela múltipla aplicação de óleo de cróton.....	49
Figura 15 -	Análise imunohistoquímica de cortes transversais de orelhas de camundongos marcados para PCNA após modelo de indução de inflamação crônica por óleo de cróton.....	50
Figura 16 -	Efeito do EBPN sobre a proliferação celular através da avaliação imunohistoquímica da marcação para PCNA após modelo de indução de inflamação crônica por óleo de cróton.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina bovina sérica
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CL	Células de Langerhans
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DE ₅₀	Dose Efetiva 50, ou seja, dose de EBPN que reduziu a resposta em 50%
EBPN	Extrato bruto hidroalcoólico de folhas de <i>Psychotria nuda</i>
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EUA	Estados Unidos
GM-CSF	Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCL	Ácido Hipocloroso
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LT	Leucotrienos
LOX	Lipoxigenase
MAPK	Proteína Quinase ativada por mitógeno
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidase
NF-Kb	Fator Nuclear – kappa B
NO	Óxido Nítrico
OC	Óleo de Cróton
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteína Quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
EPM	Erro Padrão da Média
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TGF	Fator de Crescimento Transformante
TMB	Tetrametilbenzidina.HCL
TPA	Éster de forbol 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	Ultra-Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Pele e Processo Inflamatório.....	12
1.2	Uso de Plantas Medicinais.....	24
1.3	O Gênero.....	26
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo Geral.....	29
2.2	Objetivos Específicos.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Material Botânico.....	30
3.2	Animais experimentais.....	30
3.3	Avaliação do edema de orelha.....	30
3.4	Edema de orelha agudo induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.....	31
3.5	Edema de orelha crônico induzido pela múltipla aplicação tópica de óleo de cróton.....	31
3.6	Ensaio da atividade enzimática da MPO.....	32
3.7	Ensaio da atividade enzimática da NAG.....	33
3.8	Avaliação histológica.....	34
3.9	Marcação imunohistoquímica para avaliar proliferação celular.....	34
3.10	Análise estatística.....	35
4	RESULTADOS.....	36
4.1	Edema de orelha agudo induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.....	36
4.2	Avaliação do ensaio da atividade enzimática da MPO no modelo agudo.....	38
4.3	Avaliação histológica no modelo agudo.....	39
4.4	Edema de orelha crônico induzido pela múltipla aplicação tópica de óleo de cróton.....	41

4.5	Avaliação do ensaio da atividade enzimática da MPO no modelo crônico.....	43
4.6	Avaliação do ensaio da atividade enzimática da NAG no modelo crônico.....	44
4.7	Avaliação histológica no modelo crônico.....	46
4.8	Avaliação da proliferação celular.....	49
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pele e Processo Inflamatório

A pele é o maior e mais pesado órgão do corpo humano, tendo origem através de precursores ectodérmicos (queratinócitos, melanócitos e nervos periféricos) e mesodérmicos (fibroblastos, leucócitos e vasos). Normalmente as estruturas ectodérmicas compõem a epiderme e as mesodérmicas estão mais profundamente na derme, porém durante o desenvolvimento fetal e em algumas ocasiões da vida, alguns leucócitos atravessam a barreira epiderme-derme permanecendo temporariamente na epiderme (BRAD, 2000).

Trata-se de um órgão complexo que apresenta múltiplas funções, entre elas: manutenção da homeostasia endógena (regulando a temperatura corporal e a perda de líquidos), controle do metabolismo (síntese de vitamina D), sentido do tato (por conter terminações nervosas sensitivas) e proteção contra ameaças externas (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; MAKRANTONAKI E ZOUBOULIS, 2007; PROKSCH *et al.*, 2008). Além de promover uma barreira protetora entre os órgãos internos e o ambiente externo, a pele é ainda o principal componente periférico do sistema imune, sendo capaz de iniciar uma resposta primária frente a um patógeno (PROKSCH *et al.*, 2008).

A pele é constituída de três camadas principais: a mais superficial - a epiderme, uma intermediária - a derme, e a mais profunda - a hipoderme ou tecido subcutâneo (Figura 1) (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; MAKRANTONAKI E ZOUBOULIS, 2007).

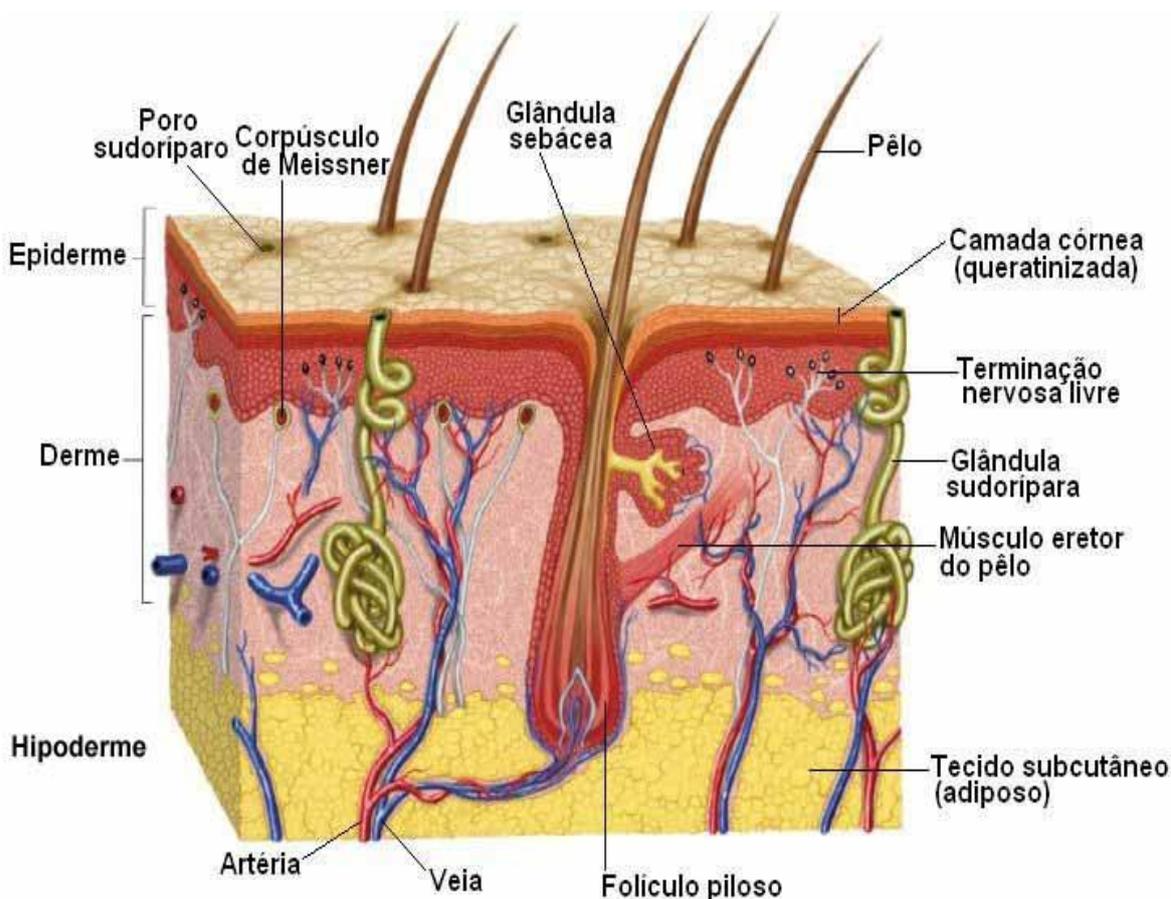


Figura 1 - Representação esquemática do corte transversal da pele, demonstrando as três camadas: epiderme, derme e hipoderme, assim como seus principais anexos.

Fonte: VILELA, A. L. M. A Pele e o Sentido do Tato. Disponível em: <<<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>>>. Acesso em 20 de novembro, 2011.

A epiderme é a camada mais superficial da pele, sendo composta por um epitélio estratificado queratinizado, cuja principal função é proteger o corpo contra estímulos nocivos do meio ambiente e diminuir a perda de líquidos (CANDI *et al.*, 2005; DENNING, 2004; MAKRANTONAKI E ZOUBOULIS, 2007). Os queratinócitos compõem cerca de 90% de todas as células encontradas na epiderme e, além de exercerem seu papel na síntese de queratina, possuem atividade bioquímica que auxiliam outras células no microambiente dérmico. Entre as atividades bioquímicas podemos citar como exemplo: a secreção de interleucina-7 (IL-7) e do fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), este responsável pela ativação e sustentação de populações de células de Langerhans e àquele um fator de crescimento e sobrevivência que dá suporte às células T epidérmicas (BRAD, 2000). A queratina, por sua vez, além de ser a principal proteína estrutural da pele, é também um obstáculo físico com papel fundamental na proteção contra a

penetração de microrganismos em compartimentos mais internos do nosso corpo (PROKSCH *et al.*, 2008).

Ainda encontram-se na epiderme outros tipos de células e estruturas, como: os melanócitos (responsáveis pela pigmentação da pele), linfócitos T, terminações nervosas, anexos cutâneos (pêlos, unhas e glândulas), além das células de Langerhans e Merkel, funcionando como parte do sistema imune e sensorial respectivamente (BRAD, 2000; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; DENNING, 2004; MAKRANTONAKI E ZOUBOULIS, 2007; PROKSCH *et al.*, 2008).

Tendo como base o grau de diferenciação dos queratinócitos, a epiderme pode ser dividida em cinco camadas ou estratos: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (Figura 2) (NORRIS, 2004). O estrato basal (também conhecido como estrato germinativo ou camada de Malpighi) está ancorado fortemente por hemidesmossomos a uma membrana basal que separa a epiderme da derme. Esta membrana basal é composta por colágeno tipo IV, laminina, glicosaminoglicanos e sulfato de heparina, todos sintetizados pelos queratinócitos, além da fibronectina que é produzida por fibroblastos dérmicos (ROBERT, 1998).

Como a epiderme é totalmente avascular, os leucócitos que residem nesta camada provêm de vasos da camada dérmica, portanto, a membrana basal citada acima também forma um obstáculo físico para a translocação dos leucócitos da derme para a epiderme, que quando recrutados para o local de inflamação devem forçar a passagem através dessa barreira resistente (BRAD, 2000). O estrato basal é ainda constituído por uma população de células epiteliais escamosas indiferenciadas que tem propriedade de auto-renovação, essas células estão ligadas entre si horizontalmente, por desmossomos, e se multiplicam continuamente através de mitoses, de forma que as novas células geradas empurram as células velhas para cima, em direção à camada mais superficial do corpo (GARTNER e HIATT, 1999; SAMPAIO *et al.*, 2000).

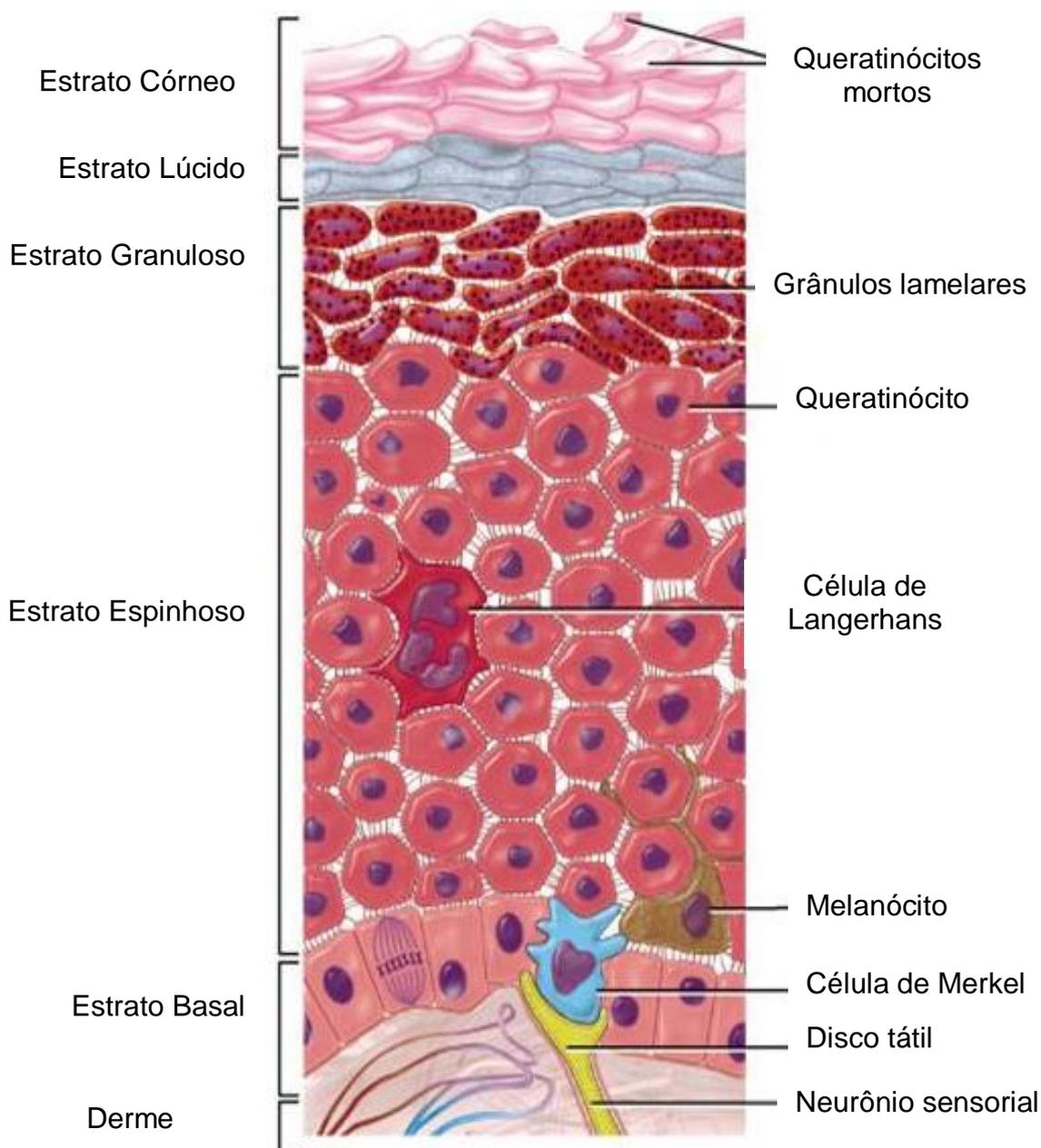


Figura 2 - Representação esquemática do corte transversal da epiderme, demonstrando as cinco camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea, assim como as células presentes nesta camada.

Fonte: EPIDERMAL LAYER, 2011. Disponível em: <<http://dmnemonics.blogspot.com/2011/12/epidermal-layer.html>>. Acesso em 15 de novembro, 2011.

À medida que os queratinócitos vão sendo produzidos na camada basal, eles migram desta camada até o estrato córneo, enquanto diferenciam-se e adquire quantidades gradualmente crescentes de proteína fibrosa, queratina, tornando-se cada vez mais achatados. É no estrato espinhoso que os queratinócitos produzem

filamentos de queratina, sendo esse estrato responsável pela queratinização. Passando para o estrato granuloso, as células tornam-se mais achatadas e com maior quantidade de queratina em seu interior, é nesse estrato que se inicia o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose e diferenciam-se em corneócitos. Já na camada lúcida são encontradas células anucleadas, achatadas e ricas em queratina. Por fim, o estrato córneo, é formado por diversas células mortas que constituem uma capa de queratina que se renova continuamente (MAKRANTONAKI E ZOUBOULIS, 2007). Esse último estrato serve como a principal barreira contra a penetração de agentes químicos e microbianos, além de ser capaz de resistir a forças mecânicas (BRAD, 2000; PROKSCH *et al.*, 2008)

Esta migração e diferenciação que ocorrem no decorrer das diferentes camadas fazem da epiderme uma estrutura bastante dinâmica e a regulação desta seqüência de proliferação dos queratinócitos é de extrema importância para a homeostasia do órgão, sendo que qualquer alteração no processo pode levar ao desenvolvimento de problemas cutâneos como psoríase, lesões crônicas e câncer de pele (ROBERT, 1998).

A derme é a camada de tecido conjuntivo intimamente ligado à epiderme, que além de sustentá-la possui uma rica rede vascular para supri-la com nutrientes. Esta camada também coordena o tráfego de leucócitos de e para a epiderme (HAAKE *et al.*, 2001). Assim como a epiderme, a derme também pode ser subdividida em camadas, porém diferentemente da camada multiestratificada que é a epiderme, a derme é dividida em apenas duas camadas: a camada papilar é a mais superficial, ficando em contato com a epiderme e sendo composta por finas fibras de colágeno tipo I, tecido conjuntivo frouxo, além de fibroblastos, leucócitos, capilares superficiais e canais linfáticos. Já a camada reticular, encontrada mais profundamente na derme, é composta por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam fibras colagenosas grossas entrelaçadas, além de conter o curso de arteríolas e vênulas que alcançam a camada papilar. Nesta camada também podemos encontrar grande número de leucócitos residentes, em sua maioria, macrófagos e mastócitos. Os macrófagos são células dotadas de mobilidade pertencentes ao sistema imune com a missão de eliminar os microrganismos, que eventualmente possam ter chegado à derme, além de fagocitar células mortas e demais resíduos. Já os mastócitos regulam o tônus vascular e iniciam respostas alérgicas e inflamatórias mediadas por

imunoglobulinas E (IgE) (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; GARTNER e HIATT, 1999; MAKRANTONAKI E ZOUBOULIS, 2007).

Ambas as camadas da derme contém, além do colágeno, outros componentes estruturais, tais como a elastina, outra proteína que confere flexibilidade à pele. Os fibroblastos, principal tipo celular presente na derme, são responsáveis pela secreção de colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina e outras proteínas da matriz celular que dão suporte e elasticidade ao órgão, além da produção de citocinas e secreção de fatores de crescimento necessários para a sobrevivência de leucócitos e queratinócitos. São também responsáveis pelo reparo de tecidos danificados, característica que se deve ao fato de serem produtores de matriz celular e proteínas estruturais (SORRELL e CAPLAN, 2004; GARTNER e HIATT, 1999).

Assim como na epiderme, a derme também abriga linfócitos T (de todos os linfócitos T da pele, 98% estão presentes na derme) e células dendríticas (BRAD, 2000; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; MAKRANTONAKI E ZOUBOULIS, 2007). Além dos apêndices epidérmicos que incluem as glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, glândulas apócrinas e folículos pilosos (Figura 1) (MAKRANTONAKI E ZOUBOULIS, 2007).

A hipoderme ou tecido subcutâneo é constituído por tecido adiposo e tecido conjuntivo frouxo e faz conexão entre a derme e a fáscia muscular, sendo a espessura da camada de tecido adiposo variável à pessoa e à localização. Essa camada é responsável pela reserva de energia, isolamento térmico do organismo, modelação da superfície corporal, absorção de choques e fixação dos órgãos (SAMPAIO *et al.*, 2000).

Portanto, uma pele saudável, além de se renovar normalmente como outros órgãos do corpo humano, é capaz de se auto-regenerar quando sofre algum tipo de lesão. E o fato da pele ser a principal interface entre o corpo e o meio externo, torna-a o primeiro alvo de bactérias, vírus e fungos, além dos irritantes físicos e químicos. Como a manutenção da integridade da pele é de extrema importância para o desempenho de suas funções em condições ótimas, ela própria possui um mecanismo que, em condições fisiológicas normais e através da renovação constante das células nas camadas mais profundas, assegura a manutenção de sua estrutura e funcionamento normal. No entanto, existem situações patológicas que comprometem este equilíbrio fisiológico, promovendo alterações estruturais e

funcionais da pele, implicando no desenvolvimento de patologias inflamatórias cutâneas (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; BRAD, 2000; MAKRANTONAKI E ZOUBOULIS, 2007; LEE *et al.*, 2009; PROKSCH *et al.*, 2008).

O processo inflamatório pode ser definido como uma cascata de eventos que ocorrem em resposta a um estímulo nocivo, trauma ou infecção (CALIXTO *et al.*, 2004). Os queratinócitos são células com grande quantidade de interleucina-1 α (IL-1 α) em seu interior, por isto são capazes de desencadear uma resposta imune quando danificados, pois a IL-1 α contida é liberada para o meio circundante iniciando a cascata inflamatória (BRAD, 2000). A IL-1 α é, portanto, um sinal de perigo imediato liberada pelos queratinócitos quando estes sofrem algum tipo de injúria (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001). Conseqüentemente, os queratinócitos circundantes respondem a IL-1 α , produzindo mais IL-1 α , bem como IL-1 β , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-6, amplificando o sinal inicial. Lesões por raios ultravioletas e infecção microbiana podem estimular diretamente a liberação destas citocinas. Além disso, os queratinócitos produzem quimiocinas, como por exemplo, a IL-8, cuja expressão causa um recrutamento de granulócitos, e, ao mesmo tempo secretam fatores de crescimento de colônia de macrófagos e granulócitos (M-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-15), esses fatores induzem a ativação e apoiam a sobrevivência dos leucócitos para responderem às quimiocinas (BRAD, 2000).

As citocinas secretadas se difundem através da membrana basal até chegarem à derme, nesta camada os fibroblastos, estimulados pelas citocinas dos queratinócitos começam a produzir IL-1, IL-6, TNF- α e quimiocinas próprias. Com todo o evento de liberação de citocinas pelos queratinócitos e fibroblastos da pele, devido a um estímulo nocivo, as células endoteliais microvasculares da derme são ativadas e fornecem um reforço para defender o órgão (LAWRENCE e GILROY, 2007; CALIXTO *et al.*, 2004). As células endoteliais então expressam a P-selectina em sua superfície, que é uma das proteínas de adesão responsável pela cascata de eventos que antecedem o extravasamento dos leucócitos para o interstício dérmico, sendo eles: marginalização, seguida do rolamento e posterior adesão ao endotélio vascular, e finalmente a diapedese dos leucócitos que são atraídos por quimiotaxia até o local da lesão. Com a chegada dos neutrófilos ao local da inflamação têm-se uma resposta mais reforçada, pois esses já iniciam fagocitose de componentes inflamatórios iniciais e antígenos, além da liberação de mais quimiocinas (BRAD, 2000).

Além da expressão de moléculas de adesão, o endotélio se contrai e abre os poros nos capilares papilares e vênulas da camada reticular e isto, somado aos efeitos promovidos pela vasodilatação, ou seja, diminuição da pressão intraluminal associada a uma menor força de cisalhamento, facilita o extravasamento dos leucócitos para o interstício extracelular. O endotélio também secreta metabólitos do ácido araquidônico (AA), como leucotrienos (LT) e prostaglandinas (PGs), resultando em vasodilatação local, aumento do fluxo sanguíneo, seguido de extravasamento de líquido e edema (BRAD, 2000; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

Enquanto isto, na epiderme, as células de Langerhans apresentam o antígeno aos linfócitos T e ativa-os gerando uma resposta imune. Após a estimulação local das células T, gera-se um ambiente muito mais complexo de citocinas na epiderme, que passam pela derme e culminam na ativação e recrutamento de leucócitos do compartimento vascular, com o objetivo de se restabelecer a homeostasia do órgão (DENNING, 2004).

A resposta inflamatória na pele também tem participação do sistema nervoso central (SNC), pois suas fibras nervosas que terminam na epiderme modulam o tônus vascular nas reações inflamatórias através de secreção de uma variedade de fatores, incluindo óxido nítrico (NO) e substância P. Além disso, o SNC recebe informações através de sinais aferentes e modula a resposta imune através de sinais eferentes, podendo gerar uma resposta estimulante ou inibitória dependendo da duração da sinalização aferente, se forem sinais agudos geram uma resposta eferente estimulante, se forem sinais prolongados provocam uma resposta inibitória (BRAD, 2000).

Assim, a estimulação das fibras nervosas pelas citocinas locais faz com que ocorra a liberação da substância P, e essa provocará nas células endoteliais uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de induzir a degranulação dos mastócitos somado ao efeito de outros neuropeptídeos. A histamina e outros mediadores liberados pelos mastócitos, por sua vez, facilitam o efluxo de leucócitos para o interstício dérmico, pois amplificam a vasodilatação local e derrame vascular (NATHAN, 2002). Assim, todos esses eventos em conjunto resultam nos quatro sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, tumor e dor (BRAD, 2000).

Portanto, já é bem reconhecido que a inflamação cutânea é produzida e mantida por essa complexa interação entre as várias células inflamatórias que

migram para o local em resposta à liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos (CALIXTO *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2009a). A regulação desse processo é crucial, pois qualquer anormalidade na resposta imune ou inflamatória está diretamente implicada na patogênese de muitas doenças cutâneas (LEE *et al.*, 2009b).

A inflamação, portanto, é uma resposta inicialmente protetora que tem por objetivo eliminar ou neutralizar o agente lesivo. E essa finalidade é concluída de modo satisfatório quando os mecanismos anti-inflamatórios endógenos são por fim ativados, protegendo os tecidos de danos maiores e promovendo a restauração de sua estrutura e função (LAWRENCE E GILROY, 2007).

A resolução da resposta inflamatória, a fim de manter a homeostasia, pode ocorrer através de vários mecanismos. Primeiro, a presença contínua de fagócitos começam a eliminar os invasores, por exemplo, diminuindo a apresentação de antígenos e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Segundo, a produção local e liberação de substâncias supressoras, como IL-10 e o fator de crescimento transformante-beta (TGF- β) por fibroblastos, macrófagos e linfócitos começam a finalizar o processo inflamatório. O TGF- β apresenta efeitos diversos como: inibição da expressão de moléculas co-estimulatórias sobre as células apresentadoras de antígenos, supressão da secreção de citocinas inflamatórias e fatores de sobrevivência das células inflamatórias. Também estimula a proliferação de fibroblastos, com conseqüente produção de matriz e colágeno para reparar os danos teciduais causados pela inflamação (BRAD, 2000; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001). Finalmente, são desenvolvidas defesas alternativas se o agente inicial não for eliminado dentro de alguns dias. A inflamação prolongada conduz à formação de abscessos e cicatrizes. Sob estímulo das citocinas IL-4 e IL-10, numa inflamação prolongada, os macrófagos começam a se aglutinar em células gigantes e inicia-se uma resposta granulomatosa com o recrutamento de fibroblastos, culminando em fibrose cicatricial do tecido danificado (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001.).

Geralmente, em condições normais, a resposta inflamatória inata tem início poucos minutos depois do estímulo e se resolve em poucas horas. Em contraste, a inflamação pode se cronificar, persistindo por semanas, meses ou até mesmo anos, fato que pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (LAWRENCE E GILROY, 2007). Entre as doenças inflamatórias crônicas, que têm como patogênese uma resposta inflamatória alterada ou intensificada, encontram-se

a doença de Crohn, esclerose múltipla, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico e vasculite sistêmica (GILROY *et al.*, 2004)

As doenças inflamatórias cutâneas podem ser desenvolvidas por estímulos endógenos ou exógenos, como alteração gênica e exposição a agentes irritantes, respectivamente. Existem vários tipos de doenças da pele que são marcadas, geralmente, por interrupção da barreira com conseqüente perda de função, proteção, seguida de inflamação, sensibilização e alterações no padrão de proliferação e diferenciação dos queratinócitos (PROKSCH *et al.*, 2008).

A mais comum dessas desordens cutâneas é a psoríase, uma doença inflamatória crônica recorrente que afeta grande parte da população mundial (SCHON E RUZICKA, 2001; LI E ARMSTRONG, 2011; ALBANESI *et al.*, 2007). Fisicamente a doença se manifesta pela presença de placas eritematosas e descamativas na pele, que podem ser isoladas ou confluentes, e geralmente acometem a região de cotovelos, joelhos, couro cabeludo e região lombar (ALBANESI, *et al.*, 2007; GUDJONSSON E ELDER, 2007; HUEBER E MCINNES, 2007). Microscopicamente é caracterizada por uma epiderme hiperproliferativa, com maturação prematura dos queratinócitos e cornificação incompleta, com retenção de células nucleadas no estrato córneo (paraqueratose). Na camada basal, a taxa mitótica é aumentada em comparação com uma pele normal, resultando num espessamento da epiderme, que forma sulcos alongados que se projetam na derme (acantose). Além disso, existe uma intensa infiltração de leucócitos acompanhada por acentuado aumento no fluxo sangüíneo local (GUDJONSSON E ELDER, 2007; HUEBER E MCINNES, 2007; PIETRZAK *et al.*, 2008; PERERA *et al.*, 2011).

É uma doença que apresenta uma grande variedade na severidade e distribuição das lesões, aparecendo sob a forma de diferentes variantes clínicas, a mais freqüente denomina-se psoríase vulgar, que pode manifestar-se de forma moderada a grave (SCHON, 1999; ALBANESI *et al.*, 2007). Normalmente ocorre o acometimento apenas da pele e anexos cutâneos (unhas), porém em alguns casos mais severos pode vir acompanhada de artrite, com inflamação e dor nas articulações (HUEBER E MCINNES, 2007).

Entretanto os aspectos físicos não são os únicos problemas a afetar os pacientes, pois a psoríase também está associada a um alto grau de morbidade, devido ao impacto psicológico negativo que incide sobre os pacientes. Pode, portanto, ser comparada a outras grandes patologias, como por exemplo, câncer,

artrite, hipertensão, diabetes, doenças cardíacas e depressão que além do desconforto físico afetam negativamente a auto-estima e saúde emocional, gerando situações de embaraços, medo, frustração e depressão. Tudo isso, gera prejuízo nos relacionamentos interpessoais e profissionais do indivíduo (GUDJONSSON E ELDER, 2007; PIETRZAK *et al.*, 2008; LI E ARMSTRONG, 2011; PERERA *et al.*, 2011).

A heterogeneidade das possíveis apresentações clínicas da doença indica a variabilidade de fatores patogênicos envolvidos, e esses podem apresentar-se de modo diferente em cada variante clínica do problema (HUEBER E MCINNES, 2007). Portanto, evidências indicam que fatores genéticos, imunes e ambientais podem estar envolvidos na patogênese da doença. Dentre os fatores ambientais encontram-se: infecções, estresse, hábitos alimentares, tabagismo, obesidade ou até mesmo uso de alguns medicamentos. De modo que o desequilíbrio no funcionamento do sistema imune também implica no desenvolvimento da psoríase. Isto porque, como visto anteriormente, o fino ajuste do sistema imune gerando uma resposta inflamatória serve como proteção para o corpo frente agressões externas. Porém, qualquer alteração nesse processo culmina numa intensificação e persistência da resposta inflamatória levando ao desenvolvimento de patologias inflamatórias, como a psoríase (HUEBER E MCINNES, 2007).

Na psoríase, as alterações imuno-inflamatórias parecem estar associadas a uma super expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23), além do IFN- γ e TNF- α . Bem como a hiperproliferação dos queratinócitos mediada por essas citocinas fazem parte da composição celular do infiltrado inflamatório nas placas psoriáticas (PIETRZAK *et al.*, 2008). Todos esses fatores que implicam no desenvolvimento da psoríase comunicam-se através de uma cascata de eventos que levam à ativação das células dendríticas, que por sua vez, vão até os linfonodos apresentar os antígenos às células T. A próxima etapa consiste na migração das células T para a pele, onde se dividem e multiplicam para desempenhar seu papel efetor, com a produção e liberação de quimiocinas, além da interação com o endotélio causando a expressão de moléculas de adesão, facilitando o extravasamento de leucócitos para o sítio lesado. Isto tudo mantém o meio inflamatório de modo a promover o combate ao estímulo agressor, porém como existe um desequilíbrio, esta resposta intensificada e persistente, ocasiona as lesões

da psoríase que são reconhecidas como estranhas reiniciando todo o processo descrito acima (PERERA *et al.*, 2011).

De maneira detalhada, como descrita acima, os queratinócitos são fontes de IL-1, uma citocina pró-inflamatória que tem papel de estimular a produção de IFN- γ , IL-2 pelas células T, além de ativar neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, assim como estimular a secreção de TNF- α , IL-6 e IL-8 pelos macrófagos, bem como é capaz de estimular a síntese de mais IL-1 por outros queratinócitos. Já a IL-6 tem o papel de comandar o crescimento e diferenciação epidermal, sendo responsável pela hiperproliferação epidermal na psoríase. Portanto, todas as células, assim como, citocinas envolvidas no processo agem de modo interativo ocasionando o desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório que causa a psoríase (PIETRZAK *et al.*, 2008; PERERA *et al.*, 2011). Contudo anteriormente achava-se que a doença tinha origem nos queratinócitos e que a inflamação era um efeito secundário, porém estudos demonstraram que as alterações proliferativas são desencadeadas pelos fenômenos inflamatórios, mediados por linfócitos T (ARRUDA *et al.*, 2004).

Os tratamentos convencionais para a doença incluem agentes tópicos ou sistêmicos com efeitos anti-inflamatórios, imunossupressores, além de radiação ultravioleta (UV). Entre eles pode-se citar o metotrexato e a ciclosporina, porém estes medicamentos clássicos apresentam falhas, recidiva da doença, assim como efeitos indesejáveis e tóxicos, como a nefrotoxicidade ocasionada pela ciclosporina (HUEBER E MCINNES, 2007; MAN *et al.*, 2008). Com os avanços na elucidação dos mecanismos etiopatogênicos da psoríase outras classes de medicamentos começaram a ser estudadas, como é o caso dos agentes modificadores da resposta biológica, ou simplesmente, biológicos. Esses incluem preparados biológicos derivados de sangue e vacinas, peptídeos ou proteínas recombinantes, terapias com anticorpos e ácidos nucleicos, além de terapias genéticas e celulares (ARRUDA *et al.*, 2004). Essa classe de medicamentos atua ao modificar a resposta imune na psoríase, como por exemplo, o alefacept que induz a morte de células T patogênicas, efalizumab que bloqueia tanto a ativação como a migração das células T, o etanercept, o infliximab e o adalimumab que atuam bloqueando a ação do TNF- α (ARRUDA *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2012).

Assim as terapias biológicas utilizadas, em geral, são bem toleradas e em alguns casos são mais eficazes do que a terapia convencional, no entanto, é

necessária uma avaliação da segurança desses agentes biológicos em longo prazo, para que se possa estabelecer a eficiência e segurança de seu uso no tratamento da psoríase (ARRUDA *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006; OTUKI *et al.*, 2011).

Outra classe de medicamentos muito utilizados no tratamento da psoríase são os corticóides, classe esta muito prescrita devido a suas propriedades anti-inflamatórias e antiproliferativas mediadas através da regulação da transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios. Esta classe promove uma diminuição da ativação de leucócitos assim como uma redução no edema dérmico e permeabilidade vascular. Existe uma variedade de apresentações de corticóides para tratamento tópico, que são variáveis quanto a sua potência, permitindo uma seleção adequada ao tipo e severidade da doença, assim como da preferência do paciente quanto ao veículo das formulações. No entanto, a utilização em longo prazo dos corticóides pode ocasionar efeitos adversos como atrofia epidérmica, erupções acneiformes, dermatite de contato e taquifilaxia. Outra alternativa para tratamento tópico é o uso de análogos da vitamina D, como calcipotrine, que se liga ao receptor dos queratinócitos provocando uma diferenciação terminal e inibição da proliferação dos queratinócitos (LI E ARMSTRONG, 2011).

Apesar das patologias inflamatórias terem sua etiologia e fisiopatologia melhor conhecidas atualmente, as terapias clássicas utilizadas para tratá-las causam uma infinidade de efeitos colaterais indesejáveis, como mencionado anteriormente (SEELIGER *et al.*, 2003; MAN *et al.*, 2008; BOLLER *et al.*, 2010). Portanto, é crescente o interesse na busca de novos fármacos para tratar os distúrbios inflamatórios cutâneos. As plantas, então, tornam-se uma importante fonte de busca para novos componentes ativos no controle de exacerbações inflamatórias cutâneas (SEELIGER *et al.*, 2003; CALIXTO *et al.*, 2004; BOLLER *et al.*, 2010).

1.2 Uso de plantas medicinais

A relação entre a natureza e os seres humanos remonta séculos (GURIB-FAKIM, 2006) e as plantas têm grande importância, pois fazem parte da base dos sistemas de medicina tradicional. Devido ao fato das plantas possuírem uma diversificada gama de componentes e estruturas químicas, não nos resta dúvidas de

que os compostos naturais continuarão a presentear a humanidade com novos medicamentos (CALIXTO, 2000; GURIB-FAKIM, 2006; ITOKAWA *et al.*, 2008; SAKLANI E KUTTY, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde grande parte da população, principalmente nos países em desenvolvimento, depende essencialmente de plantas para os cuidados principais com a saúde, no entanto, poucas espécies foram cientificamente estudadas para a avaliação de sua qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2005; GILANI E RAHMAN, 2005).

Atualmente, entre 25 a 30% de todos os fármacos disponíveis como terapêuticos são produtos naturais (plantas, micro-organismos e animais) ou são derivados de produtos naturais (NEWMAN *et al.*, 2003; BOLDI, 2004; CALIXTO, 2005; KOEHN E CARTER, 2005). Existem vários medicamentos que tiveram sua origem nas plantas, tais como quinino, digitálicos, morfina e ainda a clássica aspirina, um medicamento hoje sintetizado que teve sua estrutura derivada da espécie vegetal a *Salix alba* (SAKLANI E KUTTY, 2008).

Neste contexto de importância e diversidade de estruturas que as plantas representam é que percebemos que nos últimos anos o interesse nas espécies vegetais vem aumentando na ânsia de se descobrir novos tratamentos para doenças que não respondem satisfatoriamente às terapias existentes (HOUGHTON, 1995).

Evidências recentes da indústria farmacêutica mostram que, para algumas doenças complexas, os produtos naturais representam uma fonte extremamente valiosa para a produção de novas entidades químicas, uma vez que representam estruturas privilegiadas selecionadas por mecanismos evolutivos durante um período de milhões de anos (CALIXTO, 2005; ITOKAWA *et al.*, 2008).

Na dermatologia, não é diferente, vários estudos demonstram que as plantas têm sido utilizadas há séculos para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, incluindo a psoríase. Somado a eficácia no tratamento tem-se a vantagem de normalmente tratar-se de uma solução segura e barata (MAN *et al.*, 2008). Portanto, os pesquisadores continuam buscando nas plantas novas estruturas químicas para suprir a crescente necessidade de descoberta de novas terapias para as mais diversas patologias, inclusive as de pele. Além de poder desvendar as propriedades curativas ocultas nas plantas e também estabelecer uma exploração racional e sustentável das grandes biodiversidades (PLAEGER, 2003; CALIXTO, 2005; SAKLANI E KUTTY, 2008).

Uma das estratégias para a descoberta de novos agentes terapêuticos é a investigação de metabólitos secundários em plantas. Os alcalóides destacam-se dentre os metabólitos sintetizados por vegetais, pois são substâncias que apresentam grande diversidade estrutural, sendo responsáveis pelas atividades biológicas de muitas plantas medicinais, por este e outros motivos tornam-se bastante importantes na descoberta de novos fármacos (CORDELL *et al.*, 2001). Esses metabólitos são encontrados em muitas famílias botânicas como *Papaveraceae*, *Rutaceae*, *Apocynaceae*, *Loganiaceae* e *Rubiaceae* entre outras (KERBER *et al.*, 2008).

1.3 O Gênero

Psychotria é o maior gênero da família *Rubiaceae*, com cerca de 2000 espécies (ALMEIDA E ALVES, 2000; DAVIS *et al.*, 2001; COELHO E BARBOSA, 2004). Normalmente é representado por arbustos, pequenas árvores e ervas, trata-se de um gênero pantropical e subtropical sendo encontrado nos dois hemisférios e que pode ser dividido em três subgêneros: *Psychotria*, *Tetramerae* e *Heteropsychotria*, sendo esta divisão baseada em características morfológicas e distribuição geográfica (COELHO E BARBOSA, 2004; LOPES *et al.*, 2004). As espécies de *Psychotria* apresentam pequenas flores polinizadas por abelhas, moscas e mariposas e constituem fonte de néctar e frutos para animais, fazendo parte dos recursos utilizados pela fauna de diversas comunidades de florestas (ALMEIDA E ALVES, 2000)

Uma das características das plantas da família *Rubiaceae* é a presença de alcalóides indólicos derivados do metabolismo do triptofano, moléculas que podem apresentar diversas atividades biológicas como ação sobre o sistema nervoso central, atividade anti-inflamatória, analgésica, antioxidante e neuroprotetora (KERBER *et al.*, 2008). Os alcalóides também são o principal grupo de metabólitos secundários do gênero *Psychotria* (LOPES *et al.*, 2004).

As espécies do gênero *Psychotria*, estão sendo amplamente empregados na medicina popular, destinando-se para um grande número de indicações terapêuticas, como afecções vaginais, auxiliar no pré- e pós-parto, doenças

pulmonares, afecções cutâneas, úlceras, distúrbios do aparelho gástrico, problemas oculares, dores de cabeça e ouvido. Este uso popular faz crescer a necessidade e motiva a investigação das propriedades biológicas tanto dos extratos como dos metabólitos secundários deste grupo de espécies vegetais (ADJIBADE *et al.*, 1990).

Alguns estudos já foram realizados com espécies do gênero *Psychotria*, dentre estes estudos, pode-se citar uma pesquisa etnofarmacológica que demonstrou que camponeses da Amazônia usavam preparados caseiros com flores e frutos de *Psychotria colorata* como analgésico. A avaliação farmacológica dos alcalóides obtidos a partir de folhas e flores desta espécie mostrou atividade analgésica dose-dependente e reversível pela naloxona (AMADOR *et al.*, 1996). Outro estudo realizado com extrato de *Psychotria oleoides*, demonstrou uma importante atividade do extrato, *in vivo* e *in vitro*, sobre a secreção de hormônios hipofisários, além disso, provaram ser a psicoleína o componente principal e o responsável pela atividade inibitória sobre a secreção do hormônio do crescimento em cultura de células hipofisárias, inibição provavelmente mediada pela interação com os receptores de somatostatina (RASOLONJANAHARY *et al.*, 1995).

Dentre todas as atividades descritas acima para o gênero *Psychotria* e considerando-se a grande diversidade de estruturas entre as espécies do gênero e as importantes atividades biológicas já relatadas é que nos desperta o interesse pela espécie *Psychotria nuda* (Figura 3), a qual não possui estudos relatados na literatura sobre suas atividades terapêuticas e mostra-se uma importante possível fonte para a busca de novos fármacos para tratar, por exemplo, os problemas inflamatórios cutâneos.



Figura 3 - Foto das partes aéreas da espécie *Psychotria nuda*.
Fonte: Verdi, 2010, em Flora- RS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do extrato bruto hidroalcoólico 50% das folhas da *Psychotria nuda* (EBPN) no processo inflamatório da pele em modelos animais de inflamação aguda e crônica induzidos pela aplicação tópica de óleo de cróton em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito anti-inflamatório tópico do EBPN no modelo agudo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton;
- Analisar o efeito do EBPN na infiltração de leucócitos nos animais submetidos ao modelo agudo de indução de edema por aplicação de óleo de cróton, através da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e por análise histológica;
- Verificar o efeito da aplicação do EBPN no modelo crônico de indução de edema por múltipla aplicação de óleo de cróton, analisando o edema e peso;
- Investigar a ação do tratamento com o EBPN sobre a migração de leucócitos (neutrófilos e monócitos) nos animais submetidos ao modelo crônico de indução de edema por múltipla aplicação de óleo de cróton, através da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO), NAG e por análise histológica;
- Investigar a ação do tratamento com EBPN sobre a hiperproliferação nos animais submetidos ao modelo crônico de indução de edema por múltipla aplicação de óleo de cróton, através da análise histológica;
- Analisar o efeito do tratamento com o EBPN sobre a proliferação dos queratinócitos nos animais submetidos ao modelo crônico de indução de edema por múltipla aplicação de óleo de cróton pela análise imunohistoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

O material botânico (folhas) foi identificado e fornecido pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Kátia Christina Zuffellato-Ribas, do Departamento de Botânica da UFPR. O extrato bruto hidroalcoólico 50% das folhas da *Psychotria nuda* (EBPN) foi produzido no laboratório da Prof^a Daniela de Almeida Cabrini do Departamento de Farmacologia da UFPR.

3.2 Animais Experimentais

Camundongos da variedade Swiss fêmeas (15-35 g) fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), com acesso livre à água e ração. Os animais foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 1 hora antes do início dos experimentos, para adaptação e, usados somente uma vez em cada teste. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Paraná sob o número 390/2009.

3.3 Avaliação do edema de orelha

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura (mm) da orelha dos camundongos (Δ Espessura da orelha = espessura final – espessura inicial). A espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrômetro digital

(GREAT MT – 045B), antes e 6 horas após a indução do processo inflamatório no modelo agudo e diariamente no modelo crônico. O agente flogístico, o EBPN e dexametasona foram diluídos em 20 µL de acetona e aplicados na orelha direita de cada camundongo. Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram conduzidos sempre por um único experimentador.

3.4 Edema de orelha agudo induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton

O Óleo de Cróton (*Croton tiglium* L.) é um potente agente indutor de edema, capaz de promover uma resposta inflamatória bastante intensa, assemelhando-se a algumas doenças cutâneas (GABOR, 2000). Para avaliar a atividade dos extratos nesse modelo, o edema foi induzido pela aplicação tópica de 0,4 mg de óleo de cróton diluído em 20 µL de acetona na orelha direita dos camundongos. O EBPN (0,03; 0,1; 0,3; 0,6 e 1,0 mg/orelha) e o controle positivo dexametasona (0,05 mg/orelha), foram administrados topicamente logo após a indução do processo inflamatório, ou seja, procedeu-se a aplicação do agente indutor em todos os animais e na sequência foram aplicados os tratamentos. A espessura da orelha foi avaliada 6 horas após a aplicação do agente indutor. Após 24 horas da indução do processo inflamatório, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e círculos de 6 mm de tecido da orelha foram coletados e submetidos ao ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e análise histológica.

3.5 Edema de orelha crônico induzido pela múltipla aplicação tópica de óleo de cróton

O processo inflamatório crônico foi induzido na orelha direita dos animais pela aplicação múltipla de Óleo de cróton (0,4 mg/orelha em 20 µL de acetona) em dias alternados durante 9 dias. Esse é um modelo que permite avaliar a atividade anti-inflamatória do composto frente a um processo inflamatório já estabelecido. O EBPN

(anteriormente descrito). As amostras (1,5 ml) foram colocadas em microtubos e centrifugadas a 11.200 xg a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 30 µl do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 200 µl de uma mistura contendo 100 µl de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 85 µl de PBS 0,22 M (pH 5,4) e 15 µl de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 µl de tetrametilbenzidina.HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%, promoveu o início da reação. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 3 min, adicionando 30 µl de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) em cada poço para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) cuja leitura da absorvância é feita a 630 nm, sendo expressa em mDO/biópsia.

3.7 Ensaio da atividade enzimática da NAG

A atividade da enzima NAG é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido. A atividade da NAG foi avaliada utilizando a metodologia de SANCHEZ e MORENO (1999). As amostras de tecido (círculos de 6 mm de tecido) das orelha de camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton foram pesadas e adicionadas a 0,75 ml de solução de fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de HTAB e homogeneizadas por 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado 0,75 ml de tampão fosfato (anteriormente descrito). As amostras (1,5 ml) foram colocadas em microtubos e centrifugadas a 11.200 xg a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 25 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 100 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de p-nitrofenil-acetamida-β-D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido água miliQ. Em seguida a placa foi incubada a 37°C por 1 h e a reação interrompida pela adição de 30 µl de tampão glicina 200 nM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808), cuja leitura da absorvância é feita a 405 nm, sendo expressa em mDO/biópsia.

3.8 Avaliação histológica da pele

As amostras do tecido de orelhas coletadas dos camundongos foram fixadas em solução ALFAC (85% de etanol 80%, 10% de formol 40% e 5% de ácido acético glacial) desidratadas e emblocadas em parafina. Os blocos foram seccionados em cortes de 5 μm e esticados em lâminas. Os cortes foram desparafinizados em xilol, em seguida hidratados em sequência decrescente de álcool, finalizando com coloração em hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos foi avaliada em áreas representativas com aumento de 400x (agudo) e 200x (crônico). A quantificação da infiltração celular (leucócitos) foi realizada através de contagem, com o auxílio do programa de computador ImageJ versão 1.41 (Instituto Nacional de Saúde, EUA). A espessura da epiderme no modelo crônico foi avaliada em áreas representativas com aumento de 200x. A espessura da epiderme foi avaliada em 5 regiões ao longo de cada imagem com o auxílio do programa de computador ImageTools versão 3.0.

3.9 Marcação imunohistoquímica para avaliar proliferação celular

Cortes de 5 μm obtidos dos blocos de parafina com as amostras das orelhas, preparados como descrito anteriormente, foram acomodados em lâminas silanizadas. As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas duas vezes em xilol, 10 minutos cada, e reidratadas em concentrações de álcool decrescentes 100%, 95%, 80% e 70% para o bloqueio de radicais aldeído, os cortes foram tratados com glicina (0,1 M) por 2 minutos, enquanto que para o bloqueio de peroxidase endógena os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio em metanol a 3% por 10 minutos. Em seguida os cortes foram tratados com tampão fosfato (PBS) com 1% de albumina sérica bovina (BSA) por 30 minutos, para redução da marcação não específica. Para a detecção do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), as lâminas foram incubadas com 1:100 do anticorpo policlonal anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) diluído em PBS/BSA 1% em temperatura ambiente em câmara úmida por 2 horas, após este tempo os cortes foram lavados com PBS/BSA 1%. Posteriormente, as secções foram incubadas com anticorpo secundário IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) diluído 1:100

em PBS/BSA 1% em temperatura ambiente em câmara úmida por 1 hora. Os sítios de ligação para peroxidase foram detectadas por coloração usando cromógeno diaminobenzidina (Kit de substrato DAB), incubadas por 15 minutos. O excesso de cromógeno foi retirado em água corrente. Entre todas as etapas, os cortes foram lavados duas a três vezes em PBS. Finalmente, as lâminas contendo os cortes foram desidratadas, clareadas com xilol e montadas com Bálsamo do Canadá (ATHAR *et al.*, 2004). Para avaliação da marcação dos cortes foi utilizada lente ocular graduada e a marcação foi avaliada em áreas representativas com aumento de 200x. A quantificação da marcação da proteína PCNA foi realizada em 3-5 cortes histológicos distintos de cada grupo, sendo escolhidos 5 diferentes fotos de forma randômica de cada corte. A quantificação foi expressa em número de células por foto utilizando o programa ImageJ® versão 1.41 (Instituto Nacional de Saúde, EUA).

3.10 Análise estatística

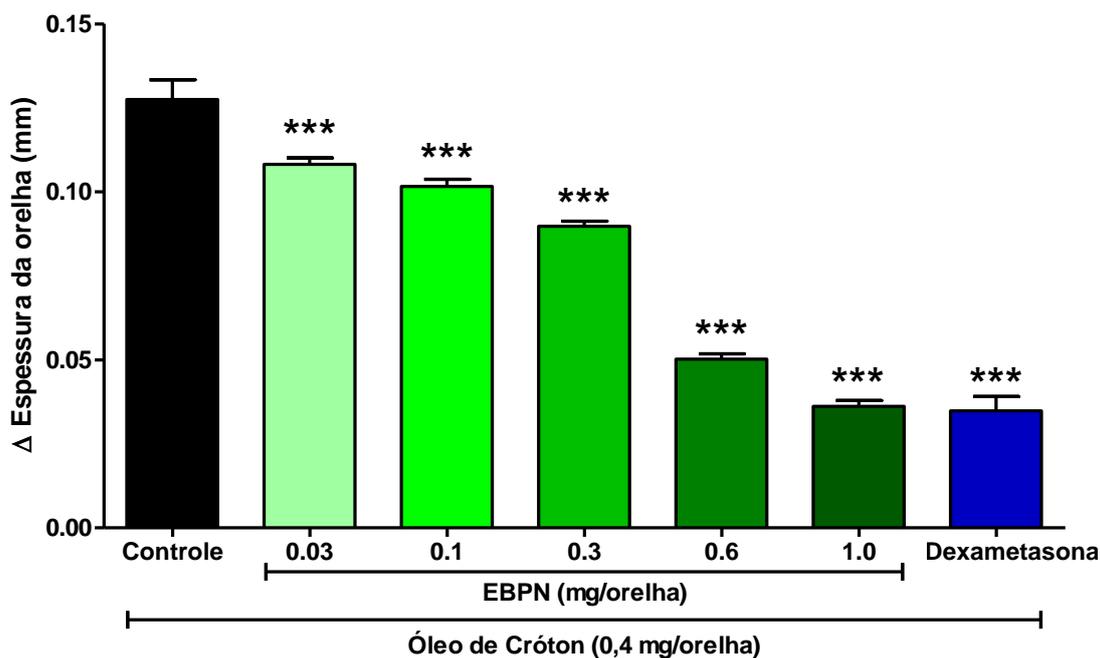
Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 5.0, São Diego, Califórnia, EUA. O cálculo da DE_{50} foi realizado através do programa Kaleida graphic.

4 RESULTADOS

4.1 Edema de orelha agudo induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton

O edema foi induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton e, em seguida tratado topicamente com EBPN (0,03 - 1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,05 mg/orelha). Os resultados demonstraram que a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo de $0,127 \pm 0,01$ mm na espessura da orelha 6 horas após a sua administração. O edema foi inibido, de maneira dose-dependente, pela aplicação tópica do extrato obtendo-se uma dose efetiva 50% (DE_{50}) igual a $0,46 \pm 0,07$ mg/orelha (Figura 4B), apresentando maior inibição com a dose de 1,0 mg/orelha de $71,6 \pm 1,3\%$. O controle positivo utilizado, dexametasona (0,05 mg/orelha) também promoveu inibição da formação do edema, correspondente a $72,7 \pm 3,4\%$ (Figura 4A).

A



B

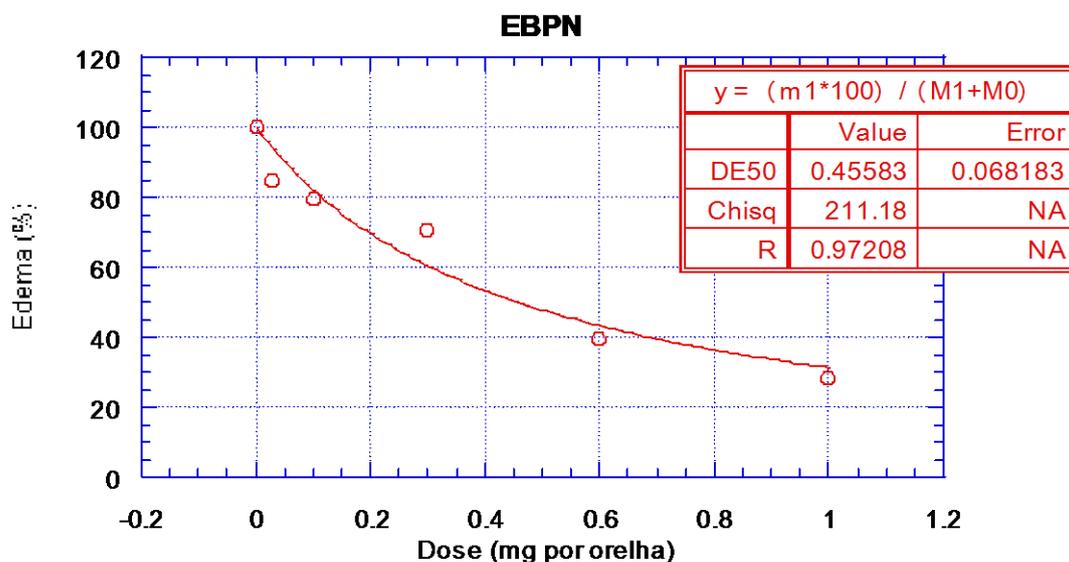


Figura 4 - (A) Curva dose-resposta e (B) Dose Efetiva 50% do EBPN no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha), em seguida, receberam os tratamentos tópicos com o EBPN (0,03 – 1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,05 mg/orelha). Após 6 horas da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. *** P<0,001 foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle.

4.2 Avaliação do ensaio da atividade enzimática da MPO no modelo agudo

A avaliação da atividade da enzima MPO é utilizada como um marcador indireto de infiltração leucocitária no tecido inflamado. Para tal, 24 horas após a indução do edema de orelha pela aplicação tópica de óleo de cróton e os respectivos tratamentos, foram coletadas amostras de tecido (6 mm) para verificar a atuação do EBPN e da dexametasona sobre este parâmetro inflamatório. Observou-se que o tratamento tópico com EBPN foi capaz de inibir significativamente a atividade da enzima MPO na pele; sendo que a maior inibição da atividade enzimática foi observada no grupo tratado com 1,0 mg/orelha do EBPN, com $73,4 \pm 0,7\%$. A dexametasona, utilizada como controle positivo, promoveu inibição de $65,0 \pm 2,2\%$, sendo ambos comparados ao grupo controle ($0,28 \pm 0,04$ mDO/biópsia) (Figura 5).

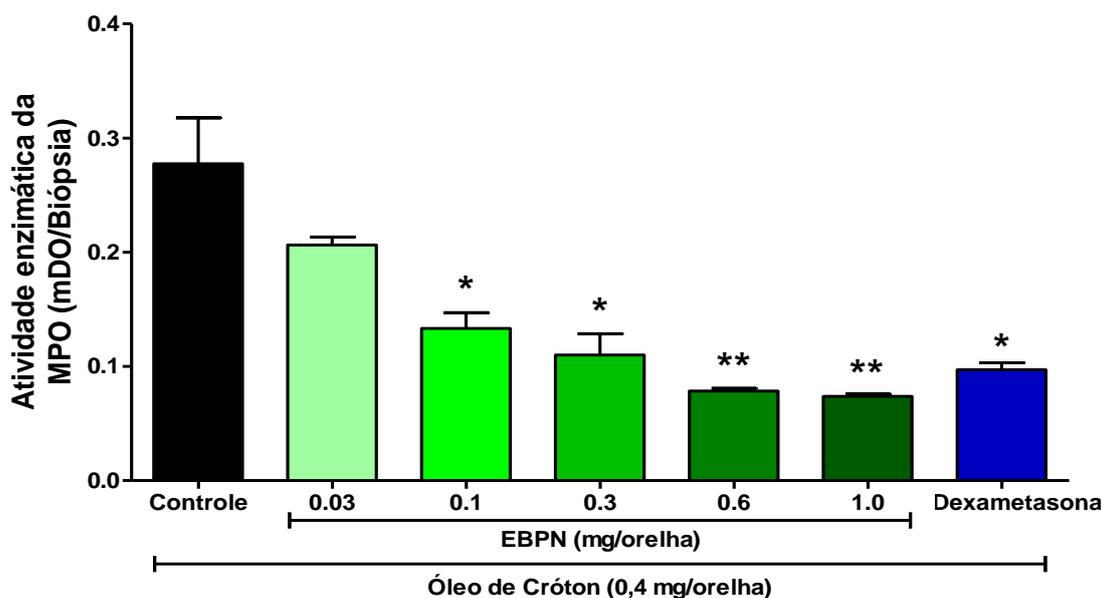


Figura 5 - Efeito dos tratamentos tópicos com EBPN e dexametasona sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha), em seguida receberam os tratamentos tópicos com os EBPN (0,03 – 1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,05 mg/orelha). Após 24 horas da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para avaliar a atividade da enzima MPO. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle.

4.3 Avaliação histológica no modelo agudo

Para verificar se a atividade anti-inflamatória apresentada pelos extratos estaria relacionada a uma redução da migração celular para o tecido lesionado, foram realizadas análises histológicas das amostras das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo agudo de edema de orelha. Observou-se que a aplicação tópica de óleo de cróton promoveu aumento na infiltração celular, culminando na formação do edema. A partir dos cortes histológicos foi possível a visualização e a quantificação da ação do extrato EBPN (1,0 mg/orelha) sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton. O extrato foi capaz de reduzir a migração celular em $37,0 \pm 2,1\%$. Enquanto a dexametasona promoveu inibição de $52,7 \pm 0,3\%$, quando comparados ao grupo controle ($116,5 \pm 4,3$ células/campo) (Figura 7). A Figura 6 mostra fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos animais, com aumento de 400x.

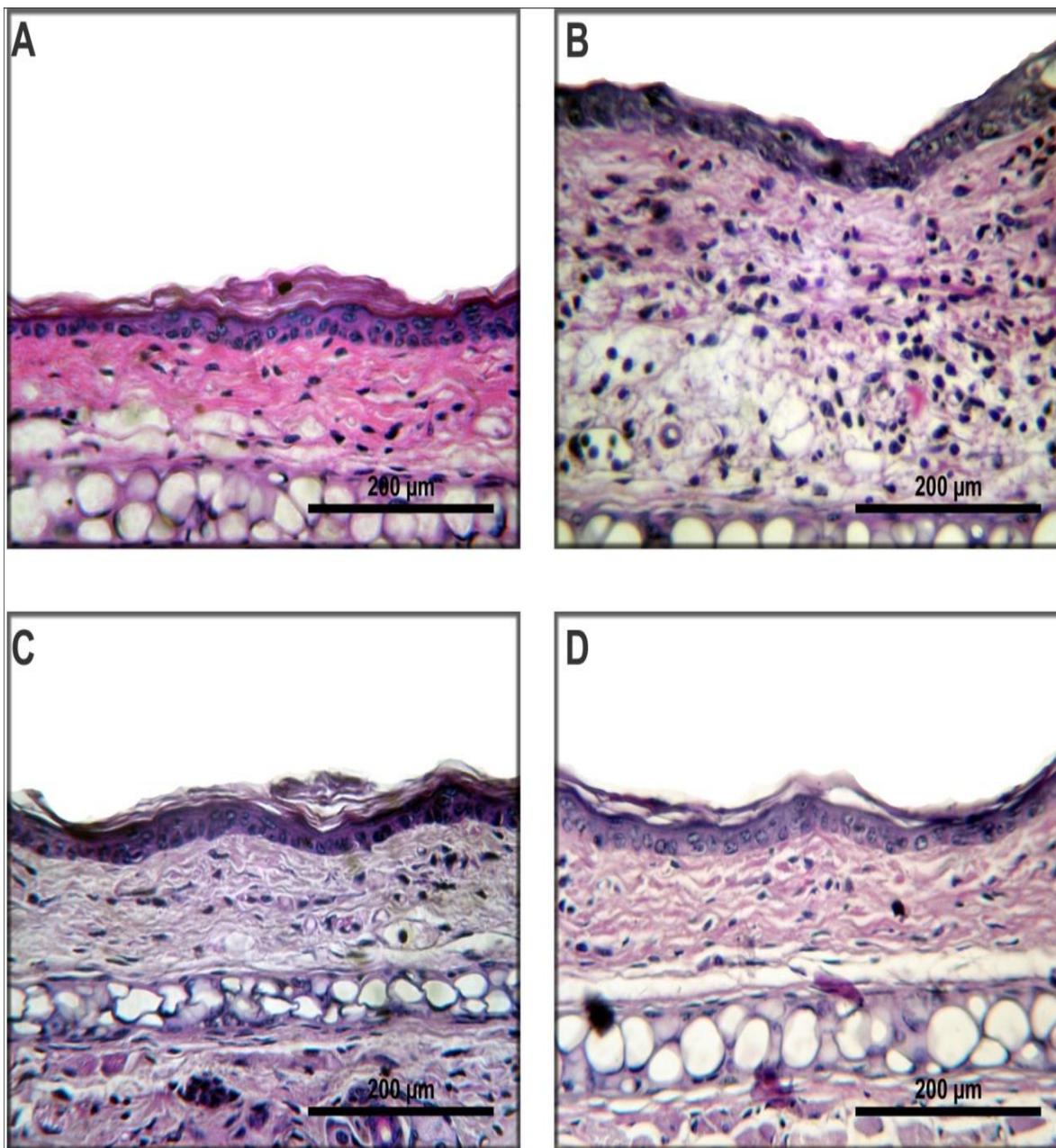


Figura 6 - Imagens representativas da histologia de cortes transversais de orelhas camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 400x, escala de 200 µm) coletadas 24 horas após a aplicação de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Sendo representados, o grupo veículo (A), que recebeu apenas 20 µl de acetona/orelha, o grupo controle (B), o grupo tratado com EBPN (C) (1,0 mg/orelha) e dexametasona (D).

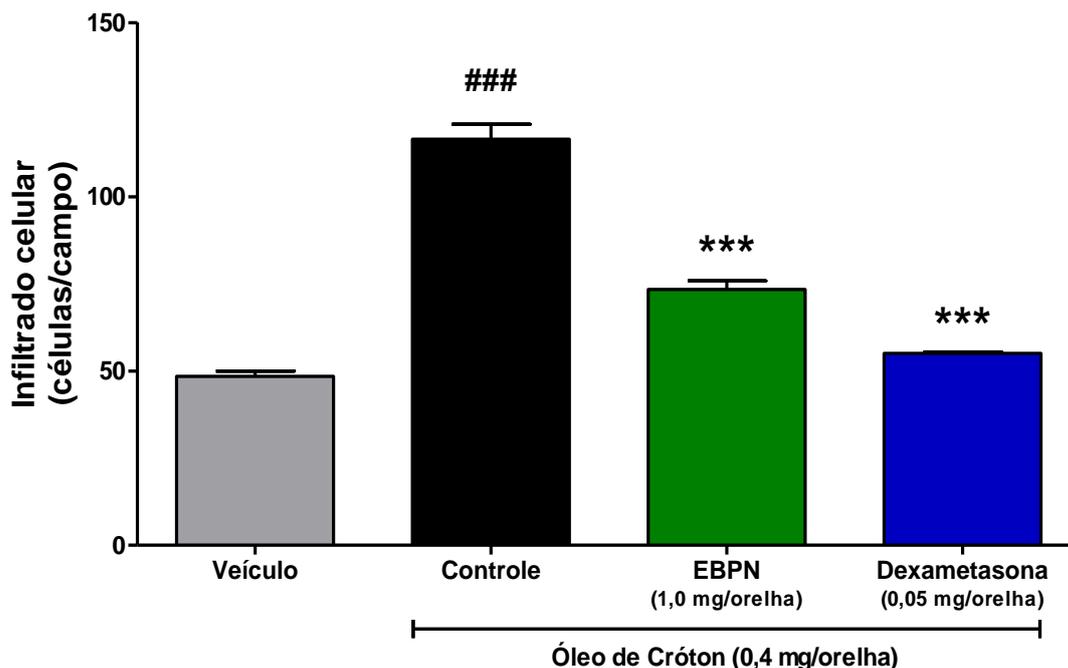


Figura 7 - Efeito do extrato e da dexametasona sobre a migração celular induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton. A quantificação foi realizada através da contagem dos leucócitos totais com aumento de 400x em cinco campos distintos de cinco cortes histológicos de cada animal por grupo. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle. Os símbolos representam o índice de significância, ### P<0,001 quando comparado o grupo controle com o grupo veículo e *** P<0,001 quando comparados os grupos tratamento com o grupo controle.

4.4 Edema de orelha crônico induzido pela múltipla aplicação tópica de óleo de cróton

As múltiplas aplicações do óleo de cróton (0,4 mg/orelha, tópico) induziram a formação do edema na orelha dos camundongos 6 horas após a primeira aplicação, aumentando nos dias seguintes e atingindo o efeito máximo no quinto dia, quando comparado ao grupo veículo (acetona). Os tratamentos (duas vezes por dia, 12 h/12 h, tópico) foram realizados do 5º ao 9º dia do experimento. A aplicação do corticóide dexametasona (0,05 mg/orelha), utilizado como controle positivo, foi capaz de impedir a formação do edema desde o 1º dia de tratamento até o final do experimento, quando comparado ao grupo controle. O grupo tratado com o EBPN

(1,0 mg/orelha) também mostrou uma redução na formação do edema durante todo o tratamento, quando comparado ao grupo controle (Figura 8).

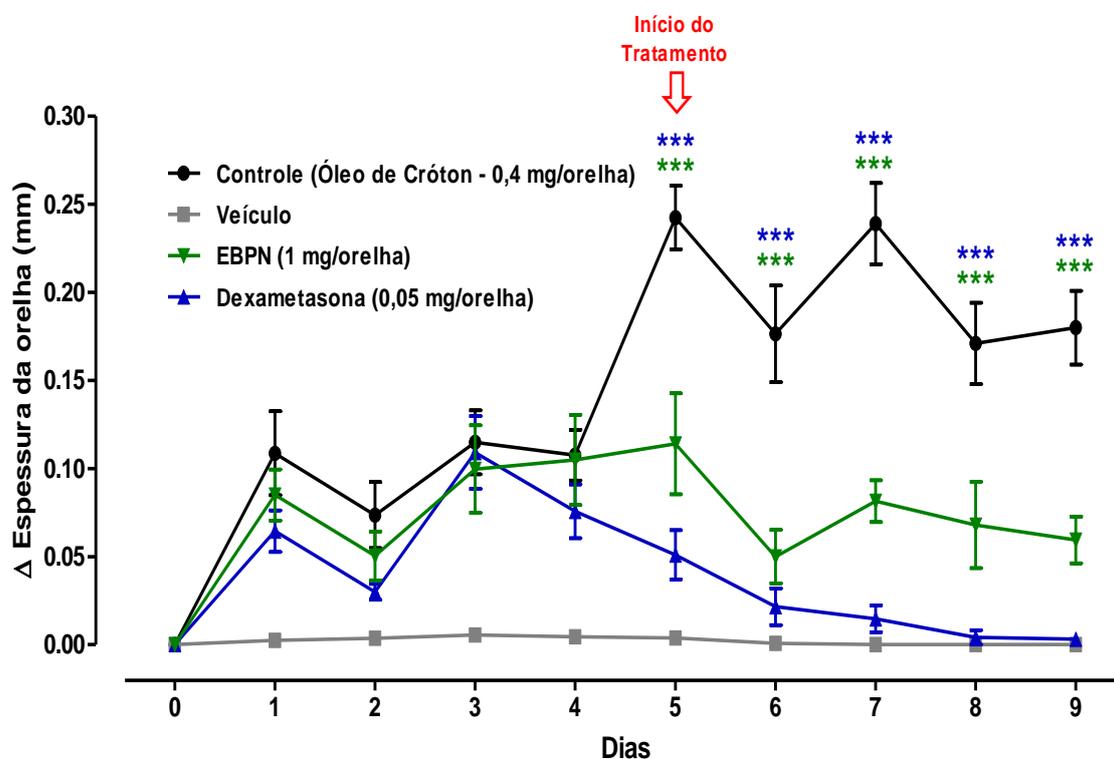


Figura 8 - Efeito do EBPN (1 mg/orelha), dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) no edema de orelha induzido pela múltipla aplicação de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia de experimento. O edema foi medido pela diferença entre a espessura basal da orelha direita e sua espessura durante os 9 dias após a indução do edema. Os pontos representam à média e barras verticais o E.P.M. de 10 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ***P<0,001 foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle.

Ao final do experimento (9º dia de experimento) as repetidas aplicações de óleo de cróton promoveram um aumento significativo no peso da orelha dos camundongos do grupo controle ($19,2 \pm 0,7$ mg) quando comparado aos grupos naive ($8,3 \pm 0,2$ mg) e veículo ($10,6 \pm 0,4$ mg). Os tratamentos com o EBPN e dexametasona causaram redução no aumento de peso das orelhas em $44,4 \pm 2,6\%$ e $70,1 \pm 1,6\%$, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Figura 9).

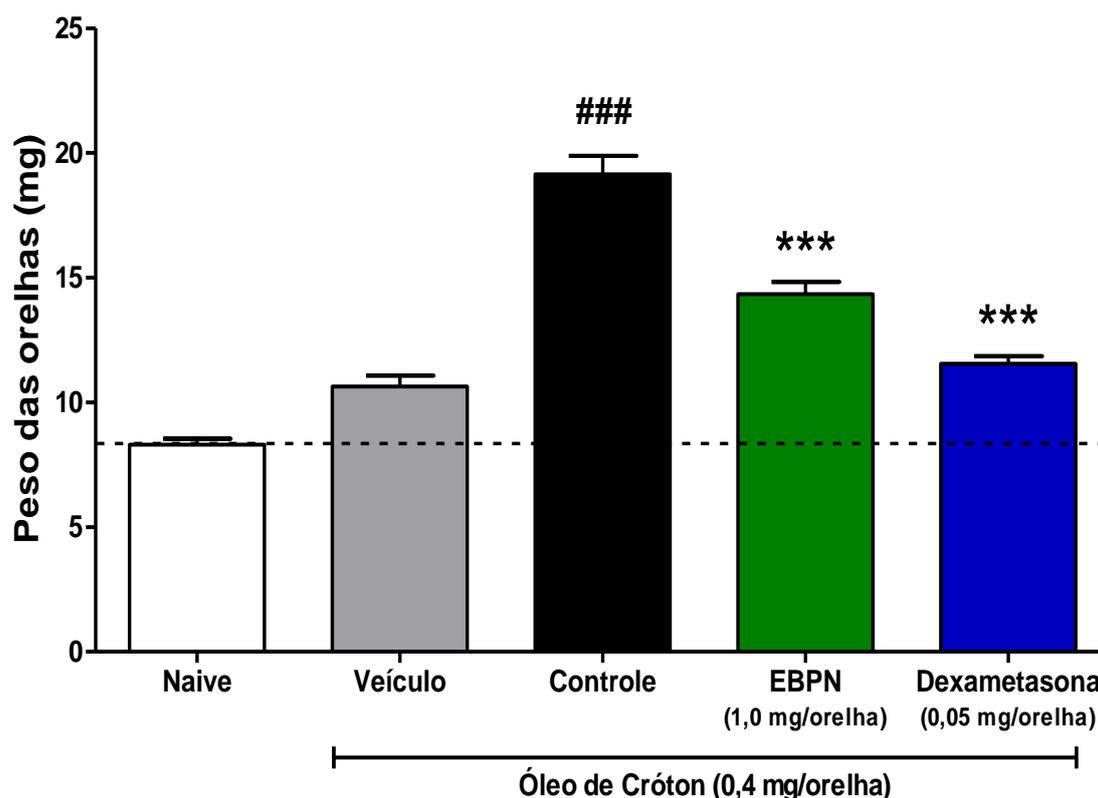


Figura 9 - Efeito do EBPN (1,0 mg/orelha), dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) no peso das orelhas no 9º dia após múltiplas aplicações de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Todos os dados apresentados representam a média \pm E.P.M. de 10 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância, quando comparado com o grupo veículo. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle.

4.5 Avaliação do ensaio da atividade enzimática da MPO no modelo crônico

A MPO é um marcador de leucócitos polimorfonucleares e a determinação da sua atividade indica de forma indireta a infiltração leucocitária no tecido lesionado. Como esperado, o tratamento repetido com óleo de cróton na orelha promoveu um aumento significativo na atividade da MPO no grupo controle ($613,0 \pm 131,7$ mDO/Biópsia), quando comparado aos grupos naive ($17,2 \pm 3,4$ mDO/Biópsia) e veículo ($18,4 \pm 0,6$ mDO/Biópsia). Nas orelhas tratadas com o EBPN (1,0 mg/orelha)

e dexametasona (0,05 mg/orelha) a atividade da MPO foi reduzida em $81,3 \pm 4,0\%$ e $100,0 \pm 0,1\%$, respectivamente, em comparação ao grupo controle (Figura 10).

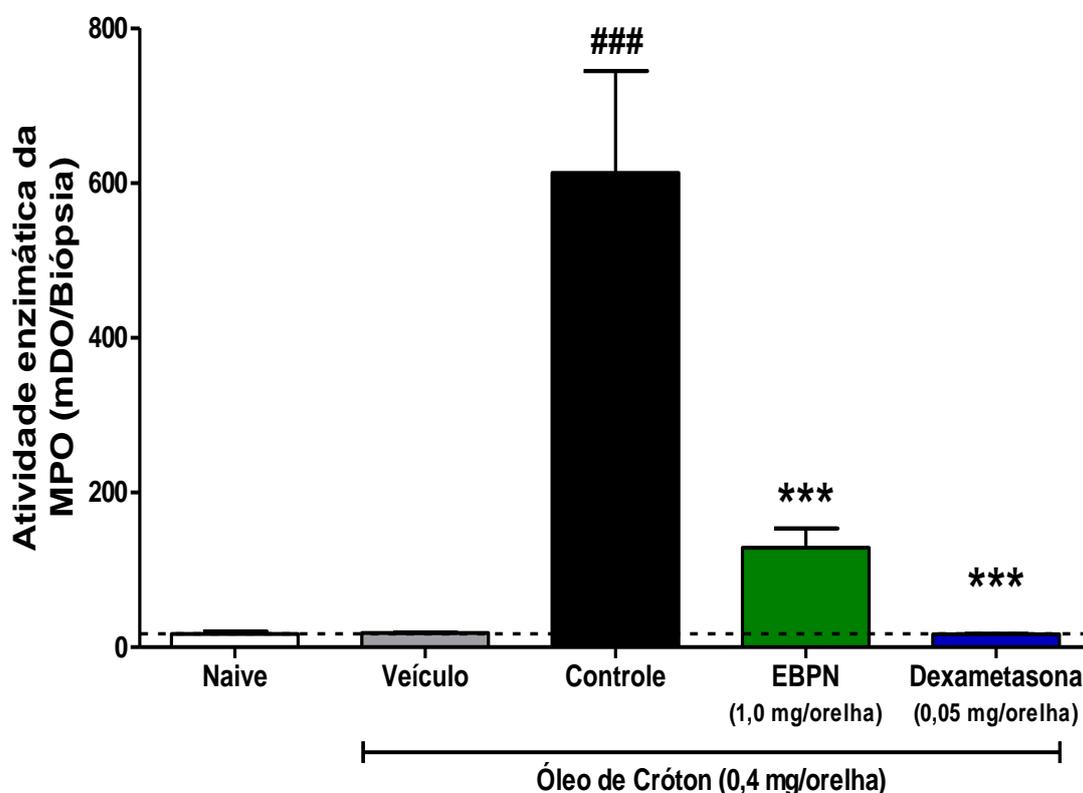


Figura 10 - Efeito do EBPN (1,0 mg/orelha), dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase em sobrenadante de orelhas tratadas com óleo de cróton. As atividades enzimáticas nas orelhas foram mensuradas no 9º dia após tratamento com múltipla aplicação de óleo de cróton. Todos os dados apresentados são média \pm E.P.M. de 5 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle.

4.6 Avaliação do ensaio da atividade enzimática da NAG no modelo crônico

A atividade enzimática da NAG é usada como indicativo indireto da presença de leucócitos mononucleares no tecido lesionado. A inflamação da pele induzida por múltiplos tratamentos com óleo de cróton promoveu um aumento da atividade da NAG no tecido do grupo controle ($125,5 \pm 7,6$ mDO/Biópsia) quando comparada aos

grupos naive ($60,6 \pm 8,2$ mDO/Biópsia) e veículo ($83,0 \pm 4,7$ mDO/Biópsia). Nas orelhas tratadas com dexametasona ($0,05$ mg/orelha) a atividade da NAG foi reduzida em $57,7 \pm 3,5\%$, em comparação ao grupo controle. O grupo tratado com EBPN ($1,0$ mg/orelha) não mostrou nenhuma alteração na atividade enzimática da NAG quando comparado ao grupo controle (Figura 11).

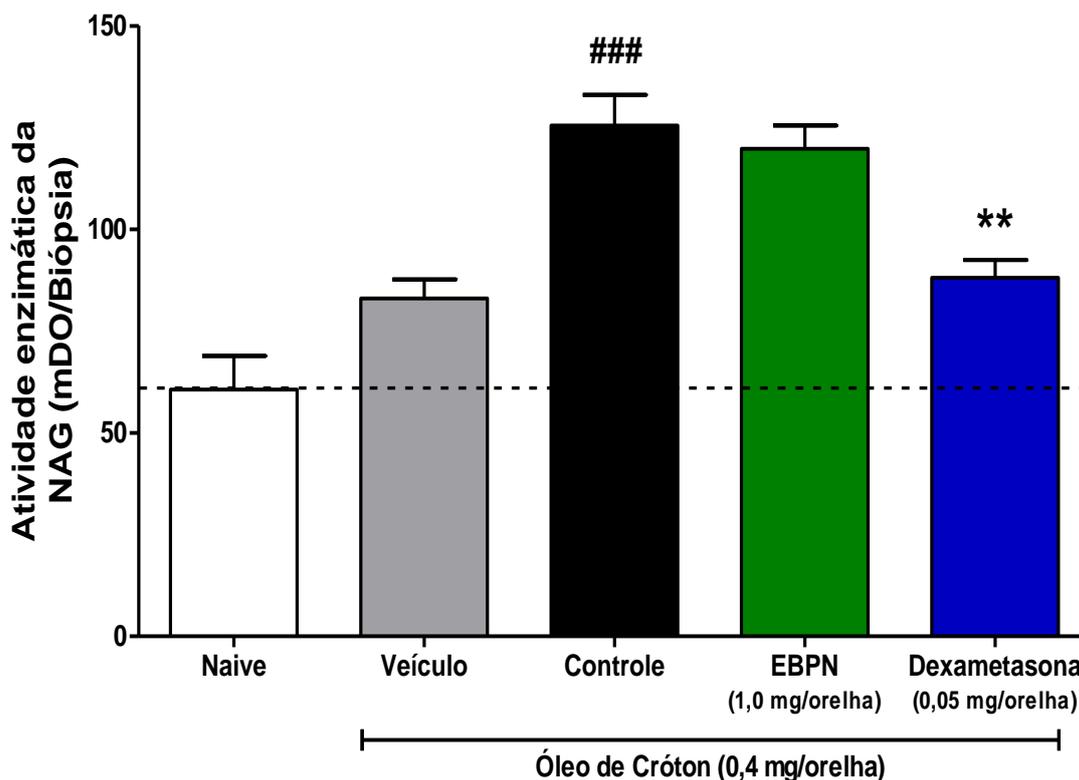


Figura 11 - Efeito do EBPN ($1,0$ mg/orelha), dexametasona ($0,05$ mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a atividade enzimática da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) em sobrenadante de orelhas tratadas com óleo de cróton. As atividades enzimáticas nas orelhas foram mensuradas no 9º dia após tratamento com múltiplas aplicações de óleo de cróton. Todos os dados apresentados são média \pm E.P.M. de 5 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo. ** $P < 0,01$ foram indicativos de significância quando comparado ao grupo controle.

4.7 Avaliação histológica no modelo crônico

A análise histológica do tecido das orelhas após o tratamento repetido com óleo de cróton (Figura 12) permitiu a avaliação da infiltração leucocitária, assim como hiperproliferação dos queratinócitos da epiderme (aumento na espessura da epiderme). Observou-se que a múltipla aplicação tópica de óleo de cróton promoveu aumento na espessura da orelha e na infiltração celular. A partir dos cortes histológicos foi possível a visualização e a quantificação da ação do extrato EBPN (1,0 mg/orelha) sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton. O extrato foi capaz de reduzir a migração celular em $79,5 \pm 1,6\%$. Enquanto a dexametasona promoveu inibição de $71,8 \pm 1,8\%$, quando comparados ao grupo controle ($331,4 \pm 23,8$ células/campo) (Figura 13). A múltipla aplicação tópica de óleo de cróton também gerou um aumento na espessura da epiderme dos animais do grupo controle ($46,6 \pm 4,1 \mu\text{m}$) em relação aos grupos naive ($8,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$) e veículo ($9,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$). Tanto o EBPN (1,0 mg/orelha), assim como a dexametasona (0,05 mg/orelha) inibiram o aumento da espessura da epiderme em $52,6 \pm 3,2\%$ e $66,3 \pm 3,5\%$, respectivamente (Figura 14). A Figura 12 mostra fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos animais, com aumento de 200x.

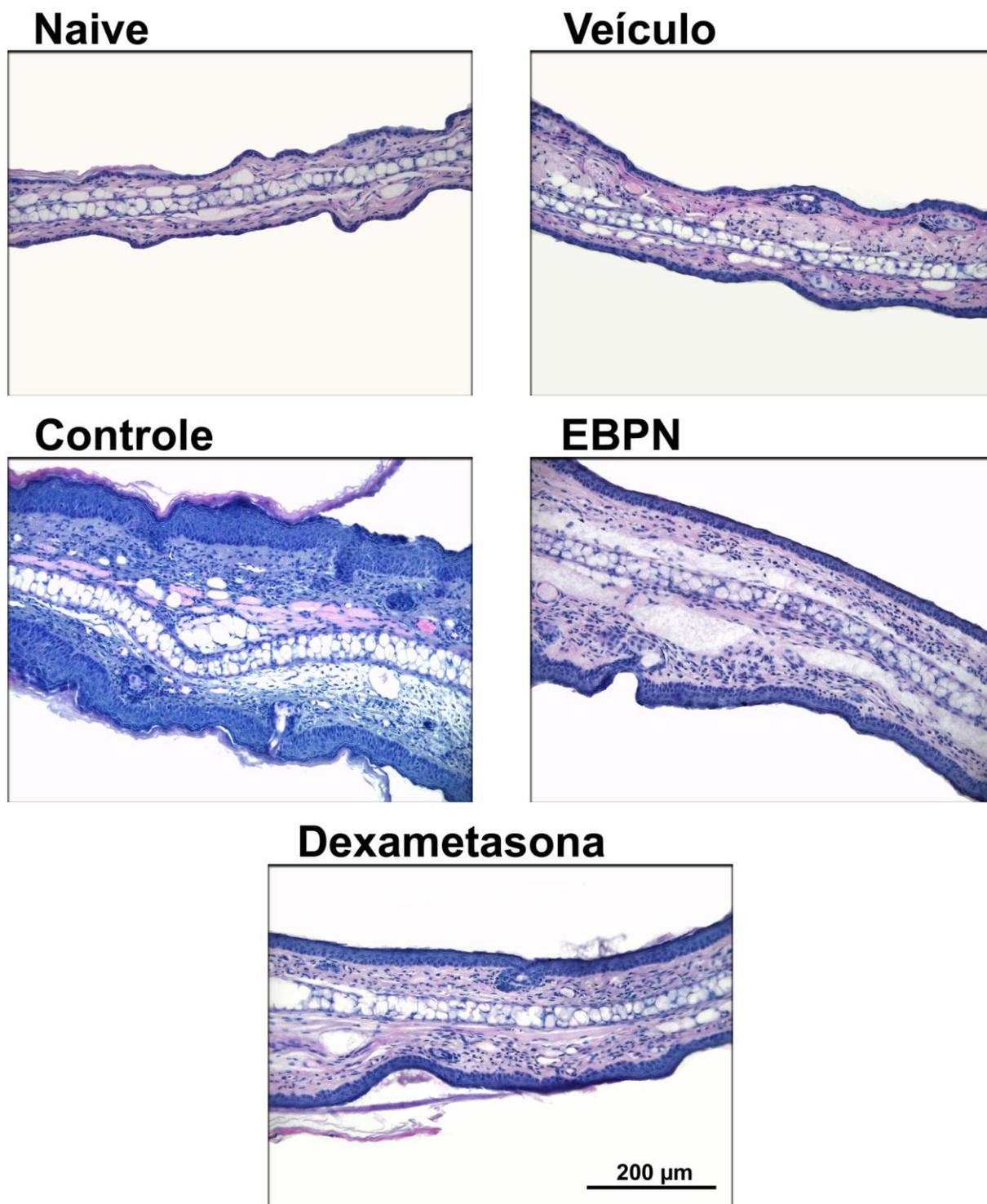


Figura 12 - Imagens representativas da histologia de cortes transversais das orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x, escala de 200 µm) coletadas no 9º dia após a múltipla aplicação de Óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Grupos: naive (sem tratamento), veículo (acetona), controle, EBPN (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia do experimento.

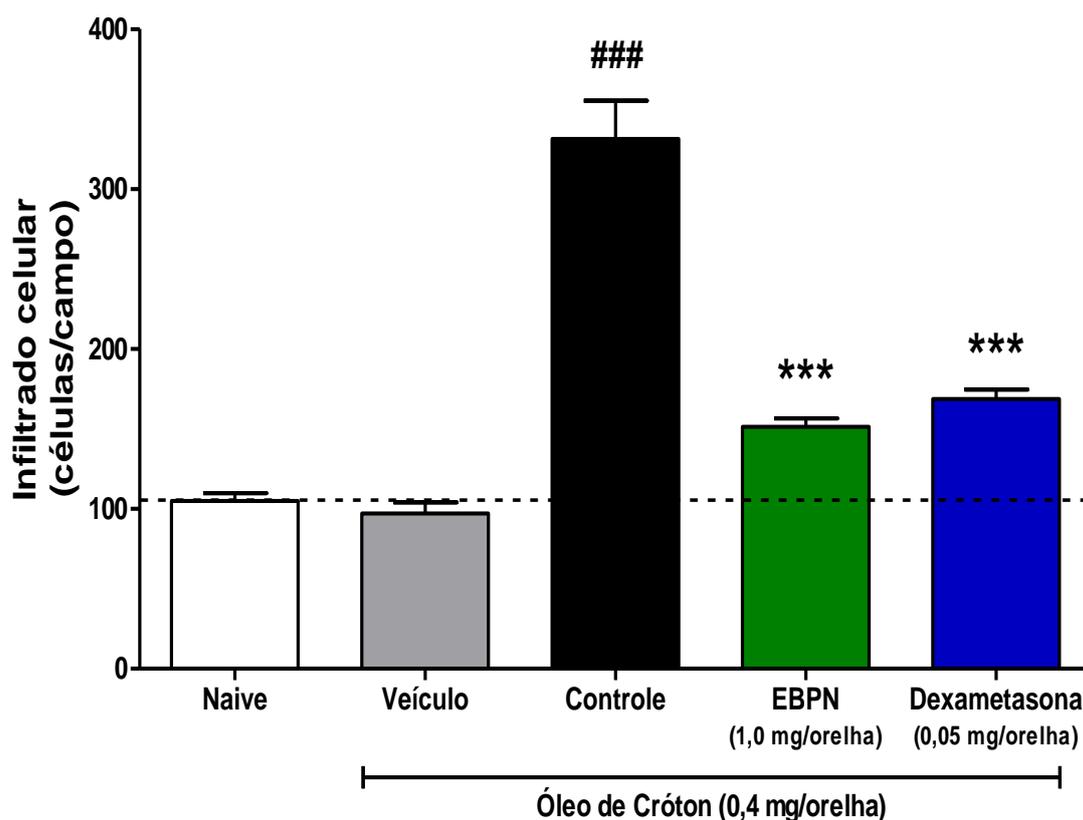


Figura 13 - Efeito do EBPN (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a migração leucocitária no 9º dia após indução com múltipla aplicação de Óleo de cróton. Todos os dados apresentados são média \pm E.P.M. de 3 animais (3 cortes por animal, 5 campos por corte) e os cortes corados com Hematoxilina-eosina. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância, quando comparado com o grupo veículo. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado com o controle.

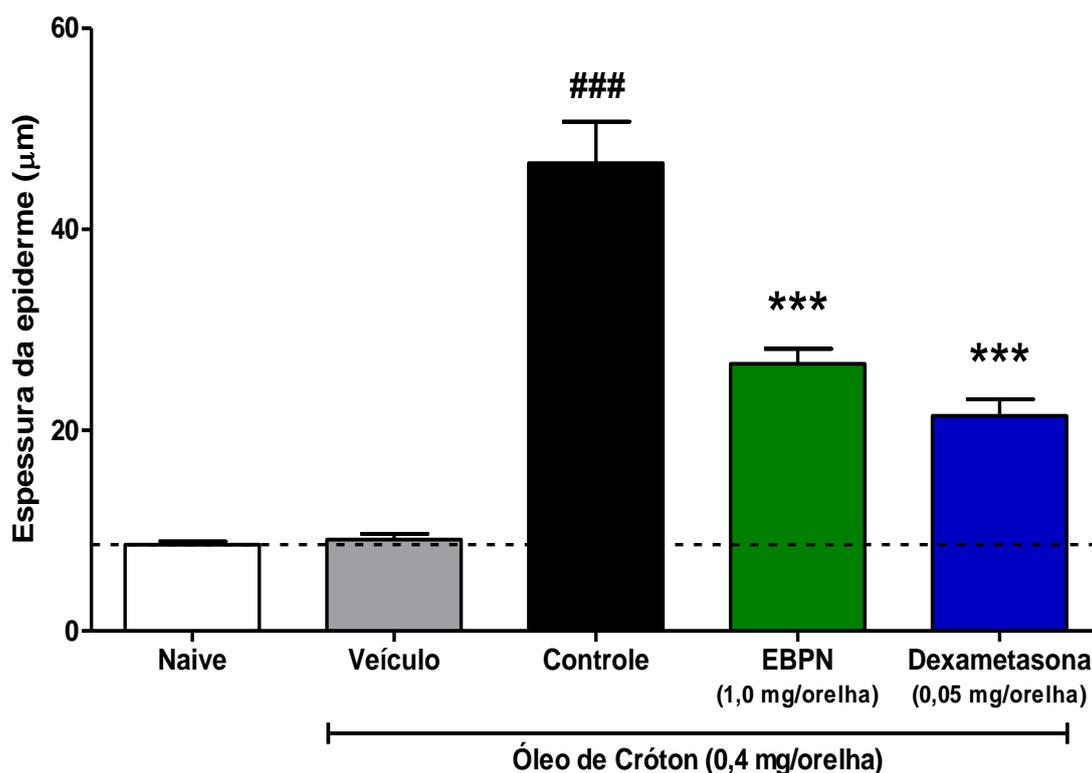


Figura 14 - Efeito do EBPN (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a espessura da epiderme no 9^o dia após indução com múltipla aplicação de Óleo de cróton. Todos os dados apresentados são média \pm E.P.M. de 3 animais (3 cortes por animal, 5 campos por corte). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância, quando comparado com o grupo veículo. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado com o controle.

4.8 Avaliação da proliferação celular

A técnica de imunomarcagem para PCNA foi utilizada para avaliar o número de células em proliferação na pele das orelhas tratadas com múltiplas aplicações de óleo de cróton. A Figura 15 mostra fotos representativas da imunohistoquímica para PCNA a qual permitiu avaliar as mudanças no padrão de proliferação celular no tecido da orelha direita dos camundongos após a múltipla aplicação do óleo de cróton e os respectivos tratamentos pela via tópica. A múltipla aplicação do óleo de cróton promoveu aumento significativo do número de células em proliferação na pele da orelha do grupo controle ($51,5 \pm 1,9$ células/campo) quando comparados com os

grupos veículo ($17,2 \pm 0,9$ células/campo) e naive ($12,7 \pm 0,8$ células/campo) (Figura 16). Os animais tratados topicamente com o EBPN ($1,0$ mg/orelha) e com a dexametasona ($0,05$ mg/orelha) apresentaram uma redução no número de células em proliferação em $76,1 \pm 1,6\%$ e $83,1 \pm 1,0\%$, respectivamente.

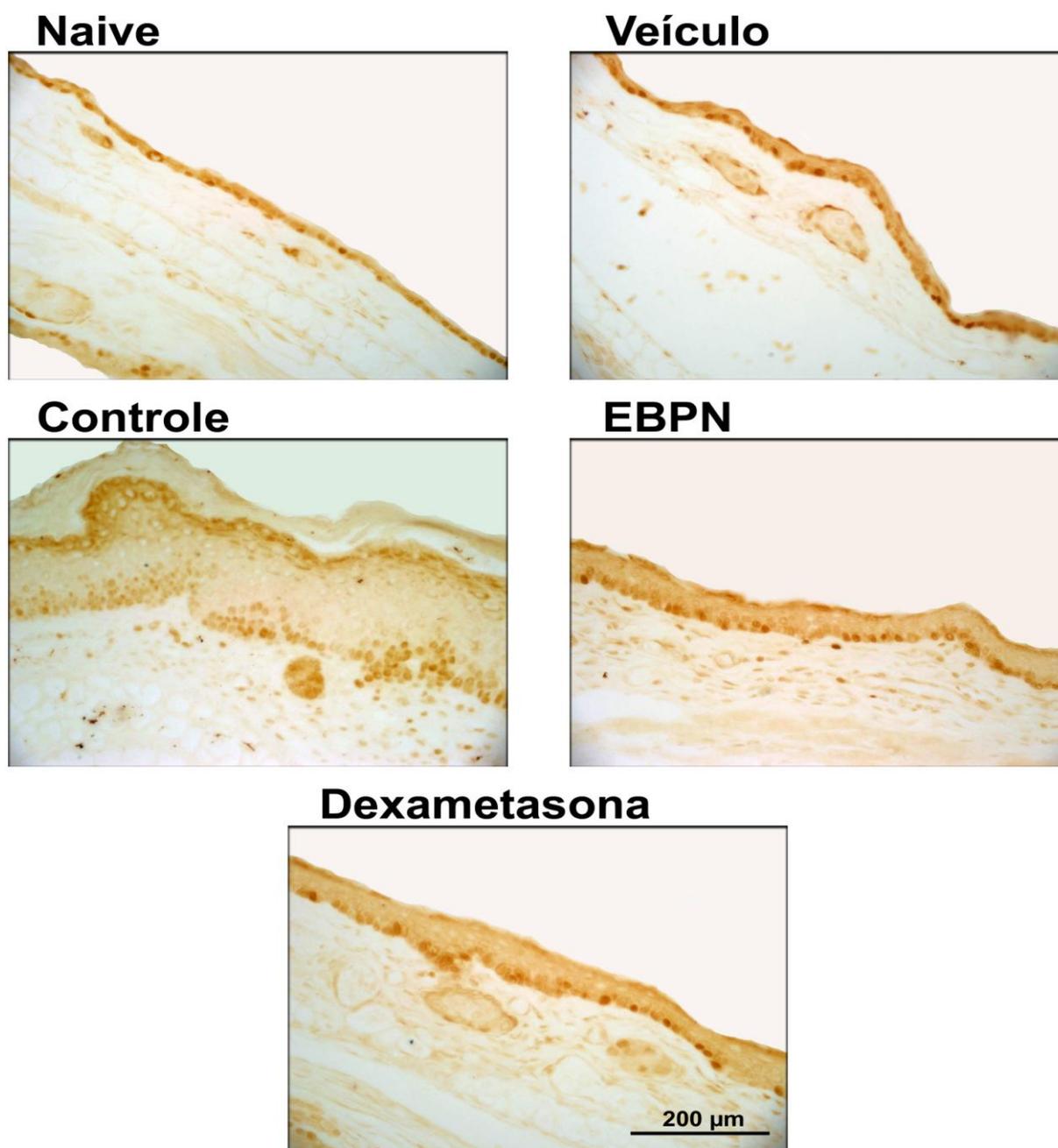


Figura 15 - Imagens representativas da marcação para PCNA por imunohistoquímica em cortes transversais das orelhas de camundongos (aumento de 200x, escala de 200 μm) coletadas no 9º dia após a múltipla aplicação de Óleo de cróton ($0,4$ mg/orelha). Grupos: naive (sem tratamento), veículo (acetona), controle, EBPN ($1,0$ mg/orelha) e dexametasona ($0,05$ mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia do experimento.

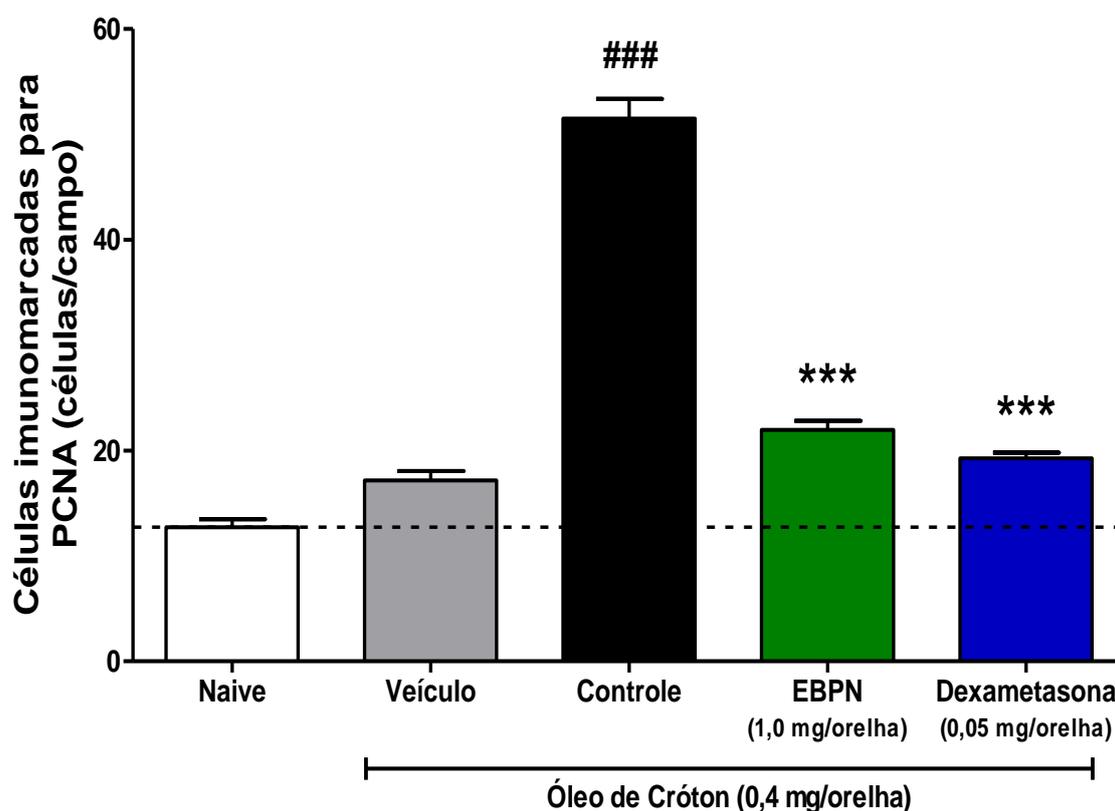


Figura 16 - Avaliação imunohistoquímica do efeito do EBPN (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a proliferação celular no 9º dia após indução com múltipla aplicação de Óleo de cróton. Todos os dados apresentados são média \pm E.P.M. de 3 animais (3 cortes por animal, 5 campos por corte), em cortes marcados com o anticorpo anti-PCNA. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância, quando comparado com o grupo veículo. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado com o controle.

5 DISCUSSÃO

O mecanismo de hiperproliferação dos queratinócitos é de extrema importância para a manutenção da homeostasia da pele quando esta sofre algum tipo de injúria, mas qualquer alteração neste processo de proliferação e diferenciação leva a uma formação defeituosa da barreira cutânea, liberação de grande quantidade de fatores de crescimento, caracterizando a patogênese de várias doenças inflamatórias cutâneas, tais como a psoríase, feridas cutâneas crônicas e até mesmo câncer de pele (ROBERT, 1998; LEE *et al.*, 2009b).

As terapias existentes atualmente para tratar tais doenças além de não promoverem a resolução total do problema, apresentam diversos efeitos indesejáveis. Por este motivo é que as plantas e seus compostos derivados representam uma importante fonte de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos. Inclusive já existem muitos estudos que comprovam o efeito anti-inflamatório de diversas plantas, reafirmando então, a importância delas na busca de novas entidades terapêuticas (CALIXTO *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2009a; CABRINI *et al.*, 2011). Assim o presente estudo procurou avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto hidroalcoólico 50% das folhas de *Psychotria nuda*, uma espécie que não possui dados relatados na literatura, mas cujo gênero mostrou, em alguns estudos, ser detentor de tal atividade.

Para avaliar o potencial deste efeito usamos modelos de inflamação agudo e crônico *in vivo* utilizando a técnica da aplicação tópica do óleo de cróton na orelha de camundongos. O óleo de cróton é uma mistura de lipídeos extraídos da espécie *Cróton tiglium* L. (Euphorbiaceae), conhecida por sua atividade flogística (WANG, 2002; DE YOUNG, 1989). O componente ativo presente no óleo de cróton é o éster de forbol 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA), cuja aplicação tópica na epiderme de camundongos causa uma série de alterações das atividades biológicas e bioquímicas, resultando numa estimulação do metabolismo do ácido araquidônico, acúmulo de neutrófilos e resposta inflamatória acentuada (JANG E PEZZUTO, 1998). Portanto, o TPA é um agente promotor de tumor, e o edema de orelha induzido por ele é um modelo animal muito utilizado para testar a atividade anti-inflamatória de diversos compostos (OTUKI *et al.*, 2005; CHUN *et al.*, 2006; MURAKAWA *et al.*, 2006). A resposta inflamatória aguda causada pelo uso tópico do

TPA apresenta eritema, vasodilatação e edema, além da infiltração de neutrófilos para o tecido (STANLEY *et al.*, 1991; OTUKI *et al.*, 2005). Já a múltipla aplicação do óleo de cróton na pele induz uma reação inflamatória persistente caracterizada por aumento do peso da orelha, infiltração leucocitária e hiperplasia epidermal (STANLEY *et al.*, 1991; ALFORD *et al.*, 1992).

Vários estudos tentaram elucidar o mecanismo de ação do TPA aplicado via tópica, e a ação se deve a várias alterações em processos celulares, como crescimento, diferenciação e morte celular além da resposta inflamatória (GARG *et al.*, 2008). Todos estes efeitos parecem estar diretamente associados à ativação direta da proteína quinase C (PKC), uma família de enzimas responsáveis por ativar uma cascata de transdução de sinais celulares. Esta enzima PKC, por sua vez, é estimulada por um mensageiro produzido a partir da ativação de receptores acoplados a proteína G, o diacilglicerol (DAG) (ANDÚJAR *et al.*, 2010). O TPA, então, ativa a PKC ligando-se a seu sítio regulatório imitando o DAG, seu ativador endógeno, promovendo assim uma ativação duradoura da enzima implicando na diferenciação dos queratinócitos, promovendo tumor epidérmico e inflamação cutânea. Assim, o tratamento com TPA promove aumento da atividade da PKC e esta ativação leva a um aumento conseqüente na ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), aumentando a liberação de ácido araquidônico (AA) e seus metabólitos leucotrienos (LT) e prostaglandinas (PGs) (GARG *et al.*, 2008). Estes metabólitos agem como mediadores nas vias inflamatórias desencadeadas pelas enzimas ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (LOX) (IKUTA *et al.*, 2008). Além de promover aumento dos eicosanóides, prostaglandina E₂ (PGE₂) e leucotrieno B₄ (LTB₄), o TPA também induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF- α), que também desempenham um papel importante na inflamação cutânea. A IL-1 β é responsável por ativar uma via que irá resultar na transcrição de genes que expressarão diversas moléculas importantes para o processo inflamatório, como quimiocinas, moléculas de adesão, citocinas secundárias, enzimas COX e óxido nítrico sintase (OTUKI *et al.*, 2005). Já o TNF- α também induz a expressão de genes que sustentam a resposta inflamatória, além de ativar a via de sinalização que irá promover a ativação do NF- κ B, que tem ação pró-inflamatória, o qual através de uma série de eventos de transdução e sinalização intracelular promovido por quinases, como p38 MAPK e ERK, promove o aumento da expressão da enzima COX e a transcrição de IL-1 β e TNF- α (CHUN *et al.*, 2006).

Portanto, não somente a inibição das enzimas LOX e COX mas também o antagonismo dos eicosanóides inibem o edema induzido por TPA e podem ser supostamente o mecanismo de ação pelo qual a substância teste está agindo (MURAKAWA *et al.*, 2006).

Assim, a inflamação é caracterizada pelos quatro sinais clássicos calor, rubor, tumor e dor. O edema (tumor) é um bom parâmetro para avaliar a inflamação da pele induzida por agentes flogísticos, portanto torna-se útil na quantificação do efeito anti-inflamatório de compostos quando testados frente ao modelo de aplicação tópica de óleo de cróton (CABRINI *et al.*, 2011). Normalmente o aumento da espessura da pele é um dos primeiros sinais que indicam irritação e inflamação local sendo, portanto, um parâmetro para avaliação de diversos processos que ocorrem durante a inflamação da pele como: aumento da permeabilidade vascular, edema e inchaço dentro da derme e proliferação dos queratinócitos da epiderme (AL-REZA *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, percebe-se que a exposição ao óleo de cróton ocasionou um aumento substancial na espessura da orelha dos camundongos do grupo controle submetidos ao modelo agudo de inflamação induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton. O EBPN, por sua vez, inibiu o edema de maneira dose-dependente no modelo de inflamação aguda, sendo que esta inibição pode ser chamada de dose-dependente porque os resultados entre as diferentes doses testadas do extrato, quando comparados entre si, foram estatisticamente diferentes. Este parâmetro da avaliação da espessura da orelha é utilizado por muitos autores para avaliar o efeito anti-inflamatório de plantas e seus compostos isolados. Alguns autores que utilizaram o modelo de inflamação aguda induzida por óleo de cróton conseguiram demonstrar que seus extratos apresentaram efeito anti-inflamatório, como por exemplo, AL-REZA *et al.*, 2010, testaram a ação do tratamento tópico com o óleo essencial de *Zizyphus jujuba* e BOLLER *et al.*, 2010, avaliaram o efeito anti-inflamatório tópico do extrato bruto de *Baccharis illinita*, ambos demonstraram inibição da formação do edema de orelha; CABRINI *et al.*, 2011, testaram a ação tópica do extrato etanólico de *Averrhoa carambola* que apresentou inibição do aumento da espessura da orelha; LEE *et al.*, 2009 também demonstraram a inibição do edema de orelha ocasionada pelo extrato etanólico de *Chrysanthemum indicum*, evidenciando o efeito anti-inflamatório do mesmo (LEE *et al.*, 2009a). Todos estes estudos corroboram com o fato de que a avaliação da espessura da orelha no

modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton é um parâmetro importante para avaliar efeito anti-inflamatório, visto que a inibição da formação do edema pode estar relacionada aos diversos fatores já citados acima, como por exemplo, a diminuição da permeabilidade vascular, edema dérmico e proliferação dos queratinócitos.

Outro modelo que permite avaliar o efeito anti-inflamatório de extratos e seus compostos, através da análise do edema causado por agentes flogísticos, é pela múltipla aplicação de óleo de cróton. Este modelo ocasiona uma resposta inflamatória prolongada, caracterizada por aumento de peso das orelhas, infiltração de células inflamatórias e hiperplasia epidermal. Permite, assim, a avaliação do efeito anti-inflamatório dos compostos num processo já estabelecido e crônico, tal fato assemelha-se com a clínica das desordens inflamatórias cutâneas, visto que o tratamento é inserido normalmente após a instalação do processo inflamatório (STANLEY *et al.*, 1991; ALFORD *et al.*, 1992).

Como os resultados obtidos no modelo agudo de edema de orelha demonstraram que o EBPN apresentou efeito anti-inflamatório, partiu-se então para a avaliação do efeito no modelo crônico. Para isto utilizou-se a dose de 1,0 mg/orelha do extrato, e obteve-se como resultado uma inibição na formação do edema visualizado através da redução da espessura e peso das orelhas dos camundongos. Foi possível observar que após o estabelecimento do processo inflamatório, tanto o EBPN quanto a dexametasona reverteram a formação do edema desde o primeiro dia do tratamento (5º dia do experimento) até o último dia do experimento. Os resultados demonstraram que houve aumento de peso das orelhas do grupo controle em relação ao grupo naive, confirmando a instalação do processo inflamatório. Ao passo que o tratamento com a dose de 1,0 mg/orelha com o EBPN, assim como com a dexametasona (0,05 mg/orelha) reduziram o aumento de peso das orelhas, evidenciando em mais um parâmetro o efeito anti-inflamatório do extrato estudado.

Na literatura podem ser encontrados estudos que comprovam o efeito anti-inflamatório de plantas e seus compostos isolados através do modelo crônico de edema de orelha em camundongos. Um estudo com um biflavonóide extraído das folhas da espécie *Ginkgo biloba* demonstrou que o composto exerce ação anti-inflamatória pela inibição do edema de orelha e da produção de prostaglandina E₂, assim como a avaliação histológica do tecido indicou a redução da hiperplasia

epidermal no grupo tratado com o composto (LIM *et al.*, 2006). LEE *et al.*, 2006, relataram que o extrato etanólico de *Chrysanthemum indicum* e *Asparagus cochinchinensis*, ambos testados no modelo crônico de edema de orelha, causam uma redução substancial na espessura e peso das orelhas indicando efeito anti-inflamatório dos extratos (LEE *et al.*, 2009a; LEE *et al.*, 2009b).

Outra característica marcante da resposta inflamatória induzida por TPA é a infiltração leucocitária. Os leucócitos são células de defesa e sua principal ação é proteger o corpo durante um processo inflamatório. Dentre eles, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, como bactérias, vírus e fungos (ARATANI *et al.*, 1999). O acúmulo de leucócitos na pele é uma característica de processos inflamatórios dérmicos, sendo importante para a manutenção da reação inflamatória, assim como para aumentar a quantidade de mediadores inflamatórios, como as enzimas COX e espécies reativas de oxigênio. O extravasamento de leucócitos para a área inflamada envolve uma interação complexa entre os leucócitos e o endotélio através da expressão de moléculas de adesão na superfície, como a P-selectina, uma proteína adesiva responsável pela ligação dos neutrófilos com o endotélio, levando a uma diminuição na velocidade destas células no leito vascular permitindo que as integrinas estabeleçam fortes ligações dos neutrófilos com o endotélio e ocorra conseqüentemente a diapedese dos neutrófilos em direção ao tecido lesado (SÁNCHEZ E MORENO, 1999). Os neutrófilos possuem em seus grânulos azurófilos a enzima mieloperoxidase (MPO) e esta quando liberada dos grânulos, na presença de íons cloro, transforma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante citotóxico que está relacionado a atividade antimicrobiana e dano tecidual causado pelos neutrófilos na inflamação (ARATANI *et al.*, 1999). Logo, MPO é um importante marcador indireto da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido lesado e a avaliação de sua atividade está relacionada à quantidade de células que migraram para o tecido inflamado (BRADLEY *et al.*, 1982; CABRINI *et al.*, 2011).

Nossos resultados demonstram um aumento na atividade enzimática da MPO nos grupos controles, tanto no modelo agudo como no modelo crônico, indicando o aumento da migração leucocitária para o tecido inflamado após a indução do agente flogístico. A dexametasona, utilizada como controle positivo, inibiu a atividade enzimática da MPO em ambos os modelos. Enquanto que, as diferentes doses (0,3; 0,6 e 1,0 mg/orelha) do EBPN testadas no modelo agudo também causaram inibição

da atividade da MPO, sendo observada maior inibição no grupo tratado com 1,0 mg/orelha do EBPN. No modelo crônico, o EBPN também inibiu de modo significativo a atividade da MPO.

Outra avaliação importante da inflamação é a atividade enzimática de NAG que é um indicador indireto da presença de leucócitos mononucleares no local da inflamação (SÁNCHEZ E MORENO, 1999). Os leucócitos mononucleares são células observadas no infiltrado quando o processo inflamatório torna-se crônico, e a NAG é uma enzima lisossomal produzida por monócitos ativados, principalmente macrófagos. Os macrófagos e monócitos, principais células mononucleares presentes no foco inflamatório, quando ativados sofrem degranulação promovendo a liberação de uma série de mediadores inflamatórios, incluindo aminas bioativas (histamina e bradicinina), citocinas, quimiocinas assim como mediadores lipídicos. As ações descritas acima levam a sustentação do processo inflamatório, já que estes mediadores promoverão o recrutamento e ativação de outras células inflamatórias (BAILEY, 1988; LAWRENCE E GILROY, 2007).

A atividade na NAG foi testada apenas no modelo crônico, já que avalia indiretamente células mononucleares que são predominantes num processo inflamatório crônico. A aplicação múltipla de óleo de cróton promoveu um aumento na atividade enzimática da NAG no grupo controle, o tratamento com a dexametasona, por sua vez, inibiu a atividade da enzima em questão. O grupo tratado com EBPN não demonstrou nenhuma alteração na atividade da NAG quando comparado ao grupo controle. Este dado nos permite saber que o extrato estudado já difere em algum ponto do mecanismo de ação da dexametasona, pois a mesma alterou a quantidade da enzima NAG no modelo crônico. Porém estudos mais aprofundados são necessários para que se defina qual é o mecanismo de ação do extrato de *P. nuda*.

Portanto ao inibir a migração de leucócitos polimorfonucleares e/ou mononucleares o extrato pode contribuir com a diminuição dos sintomas causados por estas células e mediadores, contribuindo assim para a resolução do processo inflamatório em várias doenças inflamatórias crônicas. Nossos resultados indicam que o EBPN esteja inibindo o influxo de polimorfonucleares, uma vez que este foi efetivo apenas inibindo a atividade da MPO em ambos os modelos, sem nenhuma atividade significativa sobre a NAG no modelo crônico.

Um estudo com o extrato etanólico de *Vernonia scorpioides* mostrou que o extrato inibiu a atividade da MPO frente ao modelo de indução por aplicação tópica de óleo de cróton (RAUH *et al.*, 2011). Outros trabalhos que demonstraram inibição da atividade enzimática da MPO foram com os extratos de *Glehnia littoralis* (YOON *et al.*, 2010); *Egletes viscosa* (CALOU *et al.*, 2008) e *Vitis rotundifolia* (BRALLEY *et al.*, 2008), todos indicando o efeito anti-inflamatório dos extratos testados, sendo uma das ações a provável inibição da infiltração de células polimorfonucleares no tecido lesado.

A partir dos cortes histológicos pode-se visualizar e quantificar a ação do EBPN sobre a migração leucocitária, assim como avaliar a hiperproliferação celular. As análises dos cortes histológicos no modelo agudo demonstraram o aumento da espessura da orelha e do infiltrado celular no grupo controle, indicando a instalação de um processo inflamatório induzido pelo óleo de cróton. Percebe-se que os grupos tratados com a dexametasona e com EBPN reduziram a migração leucocitária e também a espessura da orelha. Esta redução no infiltrado celular confirma o resultado obtido com a inibição da MPO, pois significa que a ação anti-inflamatória do EBPN pode estar relacionada a uma redução na migração de polimorfonucleares para o tecido lesado. A análise histológica do modelo crônico também demonstrou aumento do infiltrado celular, além do aumento da espessura da epiderme no grupo controle. Os resultados indicam que os tratamentos com a dexametasona e com o EBPN reduziram não somente o infiltrado celular, mas também inibiram o aumento da espessura da epiderme.

A hiperproliferação epidérmica é outra característica marcante do modelo de edema de orelha induzido por múltipla aplicação do óleo de cróton e que está intimamente relacionada com doenças de pele como a psoríase. O bom funcionamento e manutenção da estrutura da epiderme dependem do balanço bem controlado entre a proliferação e diferenciação dos queratinócitos. Em doenças dermatológicas hiperproliferativas observa-se que ocorre uma interrupção neste balanço e ocorre um intenso crescimento epidérmico, cujo processo é mediado por diversos fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento dos queratinócitos (KGF) que estimula proliferação celular basal (ALBANESI *et al.*, 2007). Na psoríase o início e manutenção do processo de hiperproliferação parecem estar associados primeiramente a infiltração de células T, com posterior liberação de citocinas por estas e outras células (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) que levam a

hiperproliferação. Algumas citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e IFN- γ são conhecidas como indutores diretos de hiperplasia epidermal. Além disso, as células T parecem estar envolvidas na interrupção da membrana basal da epiderme. Assim, tanto a presença de citocinas como as falhas na membrana basal podem levar a uma interpretação errada dos queratinócitos e induzir um processo de reparação, liberando citocinas mitogênicas que levarão ao crescimento epidermal. Portanto, as células inflamatórias, principalmente os linfócitos T desencadeiam e mantêm a hiperplasia crônica ao liberar citocinas pró-inflamatórias e ao quebrar a integridade epidermal (TONEL e CONRAD, 2008).

Vários estudos analisando diferentes marcadores de diferenciação e do ciclo celular demonstraram um aumento no número de integrinas, queratina e PCNA nos queratinócitos de tecidos psoriáticos (ALBANESI *et al*, 2007).

A partir do resultado obtido na análise histológica do modelo crônico cujo tratamento com EBPN apresentou inibição do aumento da espessura da epiderme, e a fim de verificar se o extrato estaria influenciando diretamente a proliferação celular da epiderme induzida pela aplicação repetida de óleo de cróton, foi realizada a técnica de imunohistoquímica com marcação do PCNA, o qual é um marcador das células que estão em processo de proliferação. Conforme observado nas fotos deste teste, em todos os grupos foram detectados células positivas para PCNA como indicativo de que estas estavam proliferando. Entretanto no grupo veículo o número de células é pequeno indicando uma proliferação basal baixa, o que é normal. O tratamento crônico com óleo de cróton propiciou o aumento no número de células em proliferação no grupo controle. Foi possível verificar através da análise imunohistoquímica que o EBPN foi capaz de reduzir o número de células positivas para PCNA no modelo crônico de edema de orelha, indicando uma diminuição na hiperproliferação epidermal induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton. Este resultado reafirma a análise histológica mostrando que a diminuição da espessura da epiderme observada seja proveniente da diminuição da proliferação celular. Avaliando o efeito do extrato etanólico da *Vernonia scorpioides*, RAUH *et al*, 2011, trabalham com o mesmo modelo de inflamação e observam que o extrato em questão reduziu a hiperproliferação epidermal, assim como outros parâmetros inflamatórios avaliados.

A inflamação cutânea é uma das principais características da psoríase, caracterizando-se por migração e acúmulo de neutrófilos e células mononucleares

na epiderme e pela secreção de citocinas por células inflamatórias, além de ocorrer um marcado espessamento epidérmico, devido ao aumento na proliferação dos queratinócitos. A epiderme torna-se, então, alongada promovendo invaginações na derme, ocorrendo também uma infiltração de leucócitos mononucleares na derme (MAN *et al.*, 2008; JACOBI *et al.*, 2006; LOWES *et al.*, 2007).

No modelo de orelha por aplicação crônica de óleo de cróton o EBPN mostrou ser efetivo, pois foi capaz de reduzir a maioria dos parâmetros inflamatórios avaliados, edema, migração celular e hiperproliferação epidérmica. Embora o modelo utilizado não seja um análogo exato da psoríase, ele apresenta algumas características como hiperplasia epidermal que permite o acesso a potenciais tratamentos para a psoríase, uma vez que as substâncias testadas sejam capazes de reduzir ou eliminar o aparecimento destes parâmetros inflamatórios.

O fato é que já temos evidências primárias importantes de que o extrato hidroalcoólico de *Psychotria nuda* apresenta uma interessante atividade anti-inflamatória tópica, reduzindo o edema de orelha e migração leucocitária em ambos os modelos, agudo e crônico, de inflamação induzido por óleo de cróton. O extrato apresentou também uma importante atividade sobre a inibição da proliferação celular avaliado pela marcação do PCNA, que indica um potencial efeito para tratar a psoríase, uma das principais doenças dermatológicas hiperproliferativas.

Contudo, outros parâmetros ainda precisam ser avaliados para elucidar o possível mecanismo de ação do EBPN, assim como análise fitoquímica do extrato de *Psychotria nuda* e análises do potencial tóxico da planta. No entanto, estas evidências abrem um leque de possíveis estudos futuros sobre a atividade anti-inflamatória de *Psychotria nuda*, visto que o EBPN demonstrou ser uma ferramenta em potencial para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que:

O EBPN foi capaz de inibir a formação do edema durante o processo inflamatório agudo na orelha de camundongos.

O tratamento com o EBPN promoveu a inibição na migração de leucócitos polimorfonucleares no modelo agudo de inflamação cutânea, observado pela análise histológica e da atividade da enzima MPO.

No modelo de inflamação crônica induzida pelo óleo de cróton, o EBPN foi capaz de reverter a formação do edema após o início do tratamento.

O EBPN inibiu de maneira significativa o aumento na atividade da enzima MPO na pele causada pela múltipla indução óleo de cróton. No entanto, não foi capaz de inibir a atividade enzimática da NAG.

O tratamento com o EBPN promoveu inibição na migração leucocitária no modelo crônico de inflamação cutânea, observado pela análise histológica.

O EBPN inibiu o aumento de peso das orelhas e também inibiu o aumento da espessura da epiderme nas orelhas dos camundongos que foram submetidos ao modelo de inflamação crônica induzida por múltipla aplicação de óleo de cróton.

O tratamento com o EBPN reduziu o número de células positivas para PCNA indicando a inibição da hiperproliferação dos queratinócitos na camada basal da epiderme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJIBADÉ, Y., SAAD, H., KUBALLA, B., BECK, J. P., SÉVENET, T., CABALION, P., ANTON, R. In vitro cytotoxicity of polyindolenine alkaloids on rat hepatoma cell lines. Structure activity relationships. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 127-136, 1990.

ALBANESI, C., DE PITÀ, O., GIROLOMONI, G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 581-588, 2007.

ALFORD, J. G., STANLEY, P. L., TODDERUD, G., TRAMPOSCH, K. M. Temporal infiltration of leukocyte subsets into mouse skin inflamed with phorbol ester. **Agents Actions**, v. 37, n. 3-4, p. 260-267, 1992.

ALMEIDA, E. M. D.; ALVES, M. A. S. Fenologia de *Psychotria nuda* e *P. Brasiliensis* (Rubiaceae) em uma área de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, p. 335-346, 2000.

AL-REZA, S. M., YOON, J., KIM, H. J., KIM, J. S., KANG, S. C. Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 639-643, 2010.

AMADOR, T. A., ELISABETSKY, E., SOUZA, D. O. Effects of *Psychotria colorata* alkaloids in brain opioid system. **Neurochem Res**, v. 21, n. 1, p. 97-102, 1996.

ANDÚJAR, I., RECIO, M. C., BACELLI, T., GINER, R. M., RÍOS, J. L. Shikonin reduces oedema induced by phorbol ester by interfering with I κ B α degradation thus inhibiting translocation of NF- κ B to the nucleus. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 376-388, 2010.

ARATANI, Y., KOYAMA, H., NYUI, S., SUZUKI, K., KURA, F., MAEDA, N. Severe Impairment in Early Host Defense against *Candida albicans* in Mice Deficient in Myeloperoxidase. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 4, p. 1828-1836, 1999.

ARRUDA, L., YPIRANGA, S., MARTINS, G. Tratamento sistêmico da psoríase - Parte II: Imunomoduladores biológicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p. 393-408, 2004.

ATHAR, M.; AN, K. P.; TANG, X.; MOREL, K. D.; KIM, A.L.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R. Photoprotective effects of sulindac against ultraviolet B-induced phototoxicity in the skin of SKH-1 hairless mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 195, n. 3, p. 370-378, 2004.

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymol**, v. 162, p. 327-34, 1988.

BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Curr Opin Chem Biol**, v. 8, n. 3, p. 281-6, 2004.

BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, E. P.; CABRINI, D. A.; PIZZOLATTI, M. G.; ZAMPRONIO, A. R.; OTUKI, M. F. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **J Ethnopharmacol**, v. 130, n. 2, p. 262-266, 2010.

BRAD, S. The cutaneous citadel: A holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, n. 5, p. 477-502, 2000.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRALLEY, E. E.; HARGROVE, J. L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D. K. Topical anti-inflammatory activities of *Vitis rotundifolia* (muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **J Med Food**, v. 10, n. 4, p. 636-642, 2007.

CABRINI, D. A.; MORESCO, H. H.; IMAZU, P.; DA SILVA, C. D.; PIETROVSKI, E. F.; MENDES, D. A.; PRUDENTE, A. S.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M.;

OTUKI, M. F. Analysis of the Potential Topical Anti-Inflammatory Activity of *Averrhoa carambola* L. in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2011.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 131-4, 2005.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part II. Modulation of Pro-Inflammatory Cytokines, Chemokines and Adhesion Molecules. **Planta Med**, v. 70, n. 02, p. 93 -103, 2004.

CALOU, I.B.; SOUSA, D.I.; CUNHA, G.M.; BRITO, G.A.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate- and oxazolone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, V. 31, P. 1511-15166, 2008.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n.4, p. 328-40, 2005.

CHI, Y.S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1271-1278, 2003.

CHUN, K. S.; KUNDU, J. K.; PARK, K. K.; CHUNG, W. Y.; SURH, Y. J. Inhibition of phorbol ester-induced mouse skin tumor promotion and COX-2 expression by celecoxib: C/EBP as a potential molecular target. **Cancer Res Treat**, v. 38, n. 3, p. 152-158, 2006.

COELHO, C. P.; BARBOSA, A. A. A. Biologia reprodutiva de *Psychotria poeppigiana* Mull. Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 481-489, 2004.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183-205, 2001.

DAVIS, A. P.; BRIDSON, D.; JARVIS, C.; GOVAERTS, R. The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 135, n. 1, p. 35-42, 2001.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, n. 3-4, p. 335-341, 1989.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 573-585, 2001.

DENNING, M.F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1141-1146, 2004.

EPIDERMAL LAYER, 2011. Disponível em: <<http://dmnemonics.blogspot.com/2011/12/epidermal-layer.html>>. Acesso em 15 de novembro, 2011.

GABOR, M. Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications. **Budapest: Akadémiai Kiadó**, p. 24-37, 2000.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A. G.; MARU, G. B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1249-1257, 2008.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p 253–259, 1999.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 43-49, 2005.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory Resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 5, p. 401-416, 2004.

GUDJONSSON, J. E.; ELDER, J. T. Psoriasis: epidemiology. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 535-546, 2007.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HAAKE, A.; SCOTT, G. A.; HOLBROOK, K. A. Structure and function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. **The Biology of the skin**, 2001.

HOUGHTON, P. J. The role of plants in traditional medicine and current therapy. **J Altern Complement Med**, v. 1, n. 2, p. 131-43, 1995.

HUEBER, A. J.; MCINNES, I. B. Immune regulation in psoriasis and psoriatic arthritis—Recent developments. **Immunology Letters**, v. 114, n. 2, p. 59-65, 2007.

IKUTA, S.; EDAMATSU, H.; LI, M.; HU, L.; KATAOKA, T. Crucial Role of Phospholipase C ϵ in Skin Inflammation Induced by Tumor-Promoting Phorbol Ester. **Cancer Research**, v. 68, n. 1, p. 64-72, 2008.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.; AKIYAMA, T.; LEE, K. H. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, n. 3, p. 263-280, 2008.

JACOBI, A.; MAHLER, V.; SCHULER, G.; HERTL, M. Treatment of inflammatory dermatoses by tumour necrosis factor antagonists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 20, p. 1171-1187, 2006.

JANG, M.; PEZZUTO, J. M. Effects of resveratrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. **Cancer Letters**, v. 134, n. 1, p. 81-89, 1998.

KERBER, V. A.; PASSOS, C. S.; VERLI, H.; FETT-NETO, A. G.; QUIRION, J. P.; HENRIQUES, A. T. Psychollatine, a Glucosidic Monoterpene Indole Alkaloid from *Psychotria umbellata*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 4, p. 697-700, 2008.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 3, p. 206-20, 2005.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007.

LEE, D. Y.; CHOI, G.; YOON, T.; CHEON, M. S.; CHOO, B. K.; KIM, H. K. Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 1, p. 149-154, 2009.

LEE, D. Y.; CHOO, B. K.; YOON, T.; CHEON, M. S.; LEE, H. W.; LEE, A. Y.; KIM, H. K. Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 28-34, 2009.

LI, K.; ARMSTRONG, A. W. A Review of Health Outcomes in Patients with Psoriasis. **Dermatologic Clinics**, 2011

LIM, H. ; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S.; KIM, H. P. Effects of anti-inflammatory biflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 5, p. 1046-1049, 2006.

LOPES, S.; Poser, G. L.; Kerber, V. A.; Farias, F. M.; Konrath, E. L.; Moreno, P.; Sobral, M. E.; Zuanazzi, J. A. S.; Henriques, A. T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 12, p. 1187-1195, 2004.

LOWES, M.A.; BOWCOCK. A.M.; KRUEGER, J.G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, v. 445, p. 866-873, 2007.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism – State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 9, p. 879-886, 2007.

MAN, M.-Q.; SHI, Y.; MAN, M.; LEE, S. H.; DEMERJIAN, M.; CHANG, S.; FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 8, p. 681-687, 2008.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1331-1336, 2006.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NORRIS, A. Targeting mast cells. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 13, n. 7, p. 739-741, 2004.

OTUKI, M. F.; REIS, R. C.; CABRINI, D.; PRUDENTE, A. S.; HORINOUCI, C. D. S.; CORRER, C. J. Patient-reported outcomes in psoriasis research and practice. **British Journal of Dermatology**, 2011.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, n. 1-3, p. 253-259, 2005.

PEREIRA, Z. V.; VIEIRA, M. F.; CARVALHO-OKANO, R. M. Fenologia da floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 471-480, 2006.

PERERA, G. K.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Psoriasis. **Annu Rev Pathol**, 2011.

PIETRZAK, A. T.; ZALEWSKA, A.; CHODOROWSKA, G.; KRASOWSKA, D.; MICHALAK-STOMA, A.; NOCKOWSKI, P.; OSEMLAK, P.; PASZKOWSKI, T.; ROLIŃSKI, J. M. Cytokines and anticytokines in psoriasis. **Clinica Chimica Acta**, v. 394, n. 1-2, p. 7-21, 2008.

PLAEGER, S. F. Clinical Immunology and Traditional Herbal Medicines. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, n. 3, p. 337-338, 2003.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

RASOLONJANAHARY, R.; SÉVENET, T.; VOEGELEIN, F. G.; KORDON, C. Psycholeine, a natural alkaloid extracted from *Psychotria oleoides*, acts as a weak antagonist of somatostatin. **European Journal of Pharmacology**, v. 285, n. 1, p. 19-23, 1995.

RAUH, L. K.; HORINOUCI, C. D. S.; LODDI, A. M. V.; PIETROVSKI, E. F.; NERIS, R.; GUIMARÃES, F. S. F.; BUCHI, D. F.; BIAVATTI, M. W.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract Against skin inflammatory processes. **J Ethnopharmacol.**, v. 138, n.2, p.390-397, 2011.

ROBERT, G. Regulation of Keratinocyte Proliferation. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 5, p. 619-622, 1998.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3-4, p. 161-171, 2008.

SAMPAIO, A. L.; RAE, G. A.; HENRIQUES, M. M. Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. **J. Leukoc Biol**, v. 67, n. 2, p. 189-95, 2000.

SÁNCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 877-879, 1999.

SCHON, M. P. Animal Models of Psoriasis - What Can We Learn from Them., v. 112, n. 4, p. 405-410, 1999.

SCHON, M. P.; RUZICKA, T. Psoriasis: the plot thickens. **Nat Immunol**, v. 2, n. 2, p. 91-91, 2001.

SEELIGER, S.; DERIAN, C. K.; VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; NAWROTH, R.; SCHMELZ, M.; VON DER WEID, P.; BUDDENKOTTE, J.; SUNDERKÖTTER, C.; METZE, D.; ANDRADE-GORDON, P.; HARMS, E.; VESTWEBER, D.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 13, p. 1871-1885, 2003.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 667-675, 2004.

STANLEY, P. L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRAMPOSCH, K. M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol**, v. 4, n. 4, p. 262-271, 1991.

TONEL, G.; CONRAD, C. Interplay between keratinocytes and immune cells-Recent insights into psoriasis pathogenesis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 2008.

VERDI, M. *Psychotria nuda* (Cham & Schltdl.) Wawra. Flora-RS, 2010. Disponível em: http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=2172. Acesso em: 20 de novembro, 2011.

VILELA, A. L. M. A Pele e o Sentido do Tato. Disponível em: <<<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>>>. Acesso em 20 de novembro, 2011.

YOON, T.; LEE, D. Y.; LEE, A. Y.; CHOI, G.; CHOO, B. K.; KIM, H. K. Anti-inflammatory effects of *Glehnia littoralis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. v. 32, n. 4, p. 663-670, 2010.