

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PRISCILLA SALLES DE BRITO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO COMPOSTO
PELLEC1 ISOLADO DA *Combretum leprosum*

PONTA GROSSA
2012

PRISCILLA SALLES DE BRITO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO COMPOSTO
PELLEC1 ISOLADO DA *Combretum leprosum*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual
de Ponta Grossa como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

PONTA GROSSA
2012

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

B858a Brito, Priscilla Salles de
Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do composto PelleC1
Isolado da *Combretum leprosum* / Priscilla Salles de Brito. Ponta Grossa,
2012.
64f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

1. *Combretum leprosum*. 2. PelleC1. 3. Inflamação. 4. Pele.
I. Otuki, Michel Fleith. II. T.

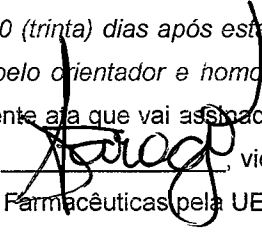
CDD : 581.634

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

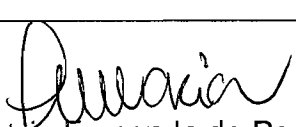
Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa

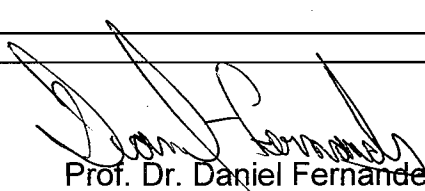
Ata nº. 11/2011

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA PRISCILLA SALLES DE BRITO, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 29 DE FEVEREIRO DE 2012, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e nove dias do mês de fevereiro de dois mil e doze, às 10:30 h, na sala 104 do bloco M da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Michel Fleith Otuki, em sessão fechada, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Priscilla Salles de Brito, 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. Michel Fleith Otuki/Presidente/UEPG, Profª. Drª. Maria Fernanda de Paula Werner/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 **"Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do composto PELLEC1 isolado da *Combretum leprosum*".** Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido emitidos os seguintes conceitos: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (aprovada), Profª. Drª. Maria Fernanda de Paula Werner (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, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago,  vice-coordenador e coordenador local do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG. Ponta Grossa, 29 de fevereiro de 2012.

Observação (se necessária).


Profª. Drª. Maria Fernanda de Paula Werner
UFPR – 1º. Avaliador


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


Prof. Dr. Michel Fleith Otuki
UEPG – Presidente

Ao meu noivo, Trajano, pelo amor, incentivo
e compreensão que foi essencial para a
realização deste trabalho
Aos meus pais, Antonio Carlos e Solange, e
aos meus irmãos, Flávia, Marília e Eduardo,
que sempre estiveram ao meu lado em todos
os momentos.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Michel Fleith Otuki, pelos ensinamentos e dedicação para a realização deste trabalho.

À Daniela Cabrini, Cíntia, Daniel, Arthur, Bruna e todos do laboratório de Inflamação da Universidade Federal do Paraná que colaboraram, e possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pela competência, e a todos os colegas do mestrado, sem eles esses dias não seriam tão alegres, divertidos e especiais.

Ao meu noivo Trajano, que sempre me apoiou, com amor, compreensão e me incentivou na busca da realização dos meus sonhos.

Aos meus pais e familiares e amigos, que sempre estiveram me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Daniel Fernandes e Dra. Maria Fernanda de Paula Werner, pela leitura e colaboração para a finalização deste trabalho.

Existem determinadas coisas que são difíceis de transformar em palavras, uma delas é quanto posso agradecer a ajuda, a compreensão, a paciência, a confiança, a dedicação e o incentivo, que recebi de várias pessoas durante a elaboração dessa dissertação.

Acredito que a simplicidade traduz mil palavras, por isso, obrigada a todos vocês.

*"Aprender é a única coisa de que a
mente nunca se cansa, nunca tem
medo e nunca se arrepende."
(Leonardo da Vinci)*

RESUMO

O PelleC1 é um composto isolado da planta *Combretum leprosum* (Combretaceae), arbusto popularmente conhecido como “mofumbo”. Esta planta é utilizada na medicina popular para a cicatrização de feridas, no tratamento de hemorragias e como sedativo. As pesquisas realizadas com os extratos atribuem à *Combretum leprosum* atividade analgésica e anti-inflamatória quando administrado por via oral. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito anti-inflamatório tópico do composto PelleC1 em modelo de inflamação crônica na pele de camundongos. A atividade anti-inflamatória do composto PelleC1 foi avaliada no modelo de inflamação crônica na orelha induzida por aplicações repetidas de 12-O-tetradecanoilforbol acetato. A aplicação tópica do PelleC1 inibiu de forma significativa o edema da orelha a partir do 6º dia de experimento ($38,12 \pm 6,89\%$) e este efeito foi intensificado no decorrer do experimento até o último dia (9º dia, redução de $62,44 \pm 6,34\%$). A redução do edema foi confirmada pela análise do peso das orelhas no término da experimentação. As orelhas tratadas com PelleC1 (0,3 mg/orelha) ou com dexametasona (0,05 mg/orelha) tiveram redução significativa no peso das orelhas de $52,34 \pm 5,13\%$ e $53,57 \pm 3,12\%$, respectivamente, quando comparados com o grupo controle ($24,03 \pm 1,65$ mg). Outro evento importante na inflamação cutânea é a infiltração de polimorfonucleares e células mononucleares, que foram avaliadas indiretamente pela determinação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG). O composto estudado reduziu a atividade da MPO e da NAG, $31,45 \pm 4,59\%$ e $39,31 \pm 0,64\%$, respectivamente, quando comparados aos controles ($0,29 \pm 0,01$ DO/Biópsia da MPO; $1,73 \pm 0,06$ DO/Biópsia da NAG). A análise histológica confirmou a inibição da migração celular e também mostrou redução importante do processo de hiperproliferação celular na epiderme pelo composto PelleC1 e pela dexametasona em $59,85 \pm 5,05\%$ e $60,10 \pm 3,77\%$, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($71,13 \pm 4,21 \mu\text{m}$). Além disso, a imunohistoquímica com antígeno nuclear de proliferação celular mostrou que o tratamento com PelleC1 reduziu a proliferação celular, assim como a dexametasona ($71,7 \pm 4,4\%$ e $66,3 \pm 0,5$, respectivamente), quando comparados com o grupo controle ($156,4 \pm 8,5$ células/campo). Os resultados obtidos sugerem que o composto PelleC1 possui potente atividade anti-inflamatória por via tópica, visto que conseguiu reduzir o edema, a migração e a proliferação celular em processos inflamatórios crônicos na pele.

Palavras-chave: *Combretum leprosum*; PelleC1; inflamação; pele.

ABSTRACT

PelleC1 is an isolated compound from the *Combretum leprosum* (Combretaceae) that is a shrub popularly known as "mofumbo". This plant is used in folk medicine for wound healing, in the haemorrhages treatment or as a sedative. Researches with the extract of the plant attribute analgesic and anti-inflammatory activity to *Combretum leprosum* when orally administered. Based on these, the aim of this study was to evaluate the topical antiinflammatory effect of the PelleC1 compound in a skin chronic inflammatory model in mice. The anti-inflammatory activity of the PelleC1 was evaluated in the model of mice ear chronic inflammatory model induced by repeated applications of 12-O-tetradecanoilforbol acetate. The topical application of PelleC1 (0.3 mg/ear) caused a significantly inhibition of ear edema induced by TPA from the 6th day of the experiment ($38.12 \pm 6.89\%$) and this effect was intensified during the experiment until the last day (9th day, reduction of $62.44 \pm 6.34\%$). The analysis of ears weight confirmed this result. The ears treated with PelleC1 or with dexamethasone (0.05 mg/ear) had a significant reduction of $30.17 \pm 2.96\%$ and $30.88 \pm 1.80\%$, respectively, on weight of the ears, when compared with the control group (24.03 ± 1.65 mg). Another important event in the skin inflammation is the infiltration of polymorphonuclear and mononuclear cells, which were indirectly evaluated by determining the activity of enzymes myeloperoxidase (MPO) and n-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG). The studied compound reduced the activity of MPO and NAG, $31.45 \pm 4.59\%$ e $39.31 \pm 0.64\%$, respectively, when compared to the controls (0.29 ± 0.01 DO/Biopsy - MPO; 1.73 ± 0.06 DO/Biopsy - NAG). The histological analysis confirmed this result and showed that compound PelleC1 and dexamethasone were able to reduce the thickness increase of the epidermis in $59.85 \pm 5.05\%$ e $60.10 \pm 3.77\%$, respectively, when compared to the control group (71.13 ± 4.21 μ m). The PelleC1 and dexamethasone also showed a reduction in cell proliferation verified by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen of $71.7 \pm 4.4\%$ e 66.3 ± 0.5 respectively, when compared with the control group (156.4 ± 8.5 cells/field). The obtained results suggest that the PelleC1 has potent topical anti-inflammatory activity, since it reduced swelling, cell migration and proliferation in chronic inflammatory processes on the skin.

Key words: *Combretum leprosum*; PelleC1; inflammation; skin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 01	Ilustração de uma secção transversal da pele demonstrando as três camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e os tipos celulares presentes.....	13
Figura 02	Esquema simplificado de uma secção transversal da epiderme.....	15
Figura 03	Imagens da <i>Combretum leprosum</i> (Mofumbo)	27
Figura 04	Efeito do PelleC1 no edema de orelha induzido por múltiplas aplicações do TPA.	36
Figura 05	Efeito do PelleC1 sobre o peso das orelhas no 9º dia após múltiplas aplicações de TPA.....	38
Figura 06	Efeito do PelleC1 sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase após múltipla aplicação de TPA	39
Figura 07	Efeito do PelleC1 sobre a atividade enzimática da n-acetil- β -d-glucosaminidase após múltipla aplicação de TPA	40
Figura 08	Imagens representativas da histologia de cortes transversais de orelhas camundongos após a múltipla aplicação de TPA.....	42
Figura 09	Efeito do PelleC1 sobre a espessura da epiderme no 9º dia após tratamento com múltipla aplicação de TPA.....	43
Figura 10	Efeito do PelleC1 sobre a migração leucocitária no 9º dia após tratamento com múltipla aplicação de TPA.....	44
Figura 11	Imagens representativas da marcação para PCNA por imunohistoquímica em cortes transversais das orelhas dos camundongos após a múltipla aplicação de TPA	46
Figura 12	Avaliação imunohistoquímica do efeito do PelleC1 sobre a proliferação celular após múltipla aplicação de TPA.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
AP-1	proteína ativadora-1
BSA	albumina sérica bovina
cAMP	adenosina 3',5'-monofosfato <i>cíclico</i>
cGMP	3',5'-Monofosfato de Guanosina Cíclica
COX	cicloxygenase
DAB	diamino-benzidina
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
HOCl	ácido hipocloroso
HTBA	hexadeciltrimetilamônio
IFN	interferon
IL	Interleucina
i-NOS	óxido nítrico sintase
KGF	fator de crescimento de queratinócitos
LOX	lipoxigenase
MAP	proteína ativada por mitógeno
mDO	mili-Densidade Óptica
MEC	matriz extracelular
mg	miligrama
mL	mililitro
MMPs	metaloproteases de matriz
MPO	mieloperoxidase
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidase
NF-κB	fator nuclear-kappa B
PBS	tampão fosfato
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE₂	prostaglandina E ₂
pH	potencial hidrogeniônico
PKC	proteína quinase C
PLA₂	fosfolipase A ₂
PMN	polimorfonucleares
TGF	fator de crescimento transformante
Th	T auxiliares
TMB	tetrametilbenzidina
TNF	fator de necrose tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol acetato
UPA	uroquinase inibidora de plasminogênio
v	volume
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
µg	micro grama
µL	micro litro
µm	micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PELE	12
1.2 INFLAMAÇÃO CUTÂNEA	16
1.3 PLANTAS MEDICINAIS	23
1.4 <i>Combretum leprosum</i>	25
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVOS GERAIS	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 OBTENÇÃO DO COMPOSTO PELLE1 ISOLADO DA <i>Combretum leprosum</i>	31
3.2 ANIMAIS	31
3.3 PROTOCOLO ANIMAL	31
3.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	32
3.5 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG (n-acetil- β -d- glucosaminidase)	33
3.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA PELE	33
3.7 MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR	34
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4 RESULTADOS	36
4.1 EFEITO DO PELLE1 NO AUMENTO DA ESPESSURA DA ORELHA INDUZIDO PELA MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA	36
4.2 EFEITO DO PELLE1 NO PESO DAS ORELHAS APÓS A MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA	37
4.3 EFEITO DO PELLE1 A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO	38
4.4 EFEITO DO PELLE1 SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG	40
4.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA EPIDERME	41
4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PELLE1 SOBRE A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	44
4.7 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	45

5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PELE

A pele é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). É um órgão complexo que recobre aproximadamente 2 m² da superfície corpórea, representando 15% do peso corporal. A pele é constituída por três camadas com estrutura e propriedades distintas: a epiderme, derme e hipoderme, dispostas e inter-relacionadas de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções (ROSS *et al.*, 1993; SCHAEFER e REDELMEIER, 1996; SAMPAIO *et al.*, 2000; HAAKE *et al.*, 2001; CHUONG *et al.*, 2002).

A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nessas camadas permite que a pele responda prontamente e efetivamente frente a estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo. São diversos os estímulos externos que podem ser nocivos, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta, extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea (WILLIAMS e KUPPER, 1996; BURBACH *et al.*, 2000; HAAKE *et al.*, 2001).

A camada superficial da pele é a epiderme, a qual é formada por células epiteliais estratificadas e está disposta acima da derme. A derme é a camada do tecido conectivo, e por sua vez, está fixada sobre a hipoderme, que é composta por tecido adiposo (FREINKEL e WOODLEY, 2001). A Figura 01 mostra as camadas da pele e as células nelas presentes.

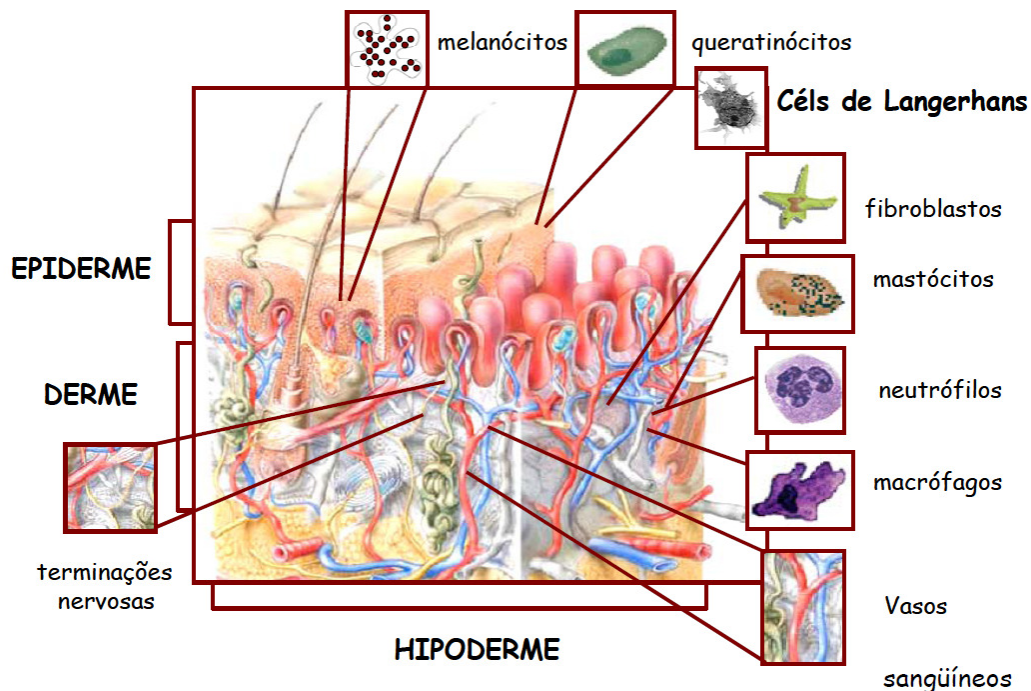


Figura 01 Ilustração de uma secção transversal da pele demonstrando as três camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e os tipos celulares presentes. Fonte: Adaptada de FREINKEL, R.; WOODLEY, D. **The biology of the skin**. Taylor & Francis, 2001.

A hipoderme, ou panículo adiposo, é a camada mais profunda da pele. Sua espessura é variável e composta exclusivamente por tecido adiposo. Sua porção superior está relacionada com a derme profunda, constituindo a junção dermo-hipodérmica. A hipoderme atua como depósito nutritivo de reserva, participa no isolamento térmico, na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a motilidade da pele em relação às estruturas adjacentes (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).

A derme tem espessura variável ao longo do organismo e é nela onde estão alojadas as estruturas anexas da pele como glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos (FREINKEL e WOODLEY, 2001). Esta camada consiste em um tecido conectivo, que confere elasticidade, força tensil e resistência mecânica à pele. Sua espessura é superior ao da epiderme, porém com uma população celular inferior (FREINKEL e WOODLEY, 2001; HAAKE *et al.*, 2001). Sua interação com a epiderme ocorre através da junção dermoepidérmica, garantindo assim as trocas de elementos nutritivos e metabólicos entre essas camadas (HAAKE *et al.*, 2001).

A derme é formada por um tecido conjuntivo rico em mucopolissacarídeos e fibras colágenas, elásticas e reticulares (FREINKEL e WOODLEY, 2001). Também na

constituição da derme estão: polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares), receptores sensoriais (ex., corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos (ROSS *et al.*, 1993; HAAKE *et al.*, 2001).

O principal tipo celular encontrado na derme são os fibroblastos os quais são capazes de migrar através do tecido e são responsáveis pela síntese e degradação de proteínas de tecido conectivo fibroso e não fibroso. Além disso, os mesmos fibroblastos também são capazes de sintetizar mais de um tipo de proteína simultaneamente, por exemplo, colágeno e elastina (FREINKEL e WOODLEY, 2001). O colágeno e outras diferentes macromoléculas sintetizadas entram na constituição da matriz extracelular (ROSS *et al.*, 1993; HAAKE *et al.*, 2001). Durante um processo inflamatório, há um aumento da proliferação e da atividade dos fibroblastos, isso ocorre pela ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina (IL)-1 α e IL-1 β (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

A epiderme é constituída por um tecido multiestratificado do tipo pavimentoso, o qual através de um processo de diferenciação progressiva (queratinização e cornificação) é constantemente renovado. A diferenciação começa na camada basal em direção à camada superficial (córnea). A proliferação, a diferenciação e a morte celular ocorrem sequencialmente e cada processo é caracterizado pela expressão de proteínas específicas, sendo que certas doenças podem ser decorrentes de anomalias nessas proteínas (CANDI *et al.*, 2005).

A espessura deste epitélio pavimentoso apresenta variações topográficas ao longo do organismo (SAMPAIO *et al.*, 2000; CANDI *et al.*, 2005). Na pele espessa, podem ser distinguidas cinco camadas na epiderme: a camada córnea, o estrato lúcido, o estrato granuloso, o estrato espinhoso e o estrato basal, esta a camada mais profunda. Na pele delgada, o estrato lúcido não está presente (ROSS *et al.*, 1993). A pele espessa é encontrada na palma das mãos e na planta dos pés, sendo o restante do corpo protegido pela pele delgada (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A Figura 02 mostra um esquema da epiderme em um corte transversal.

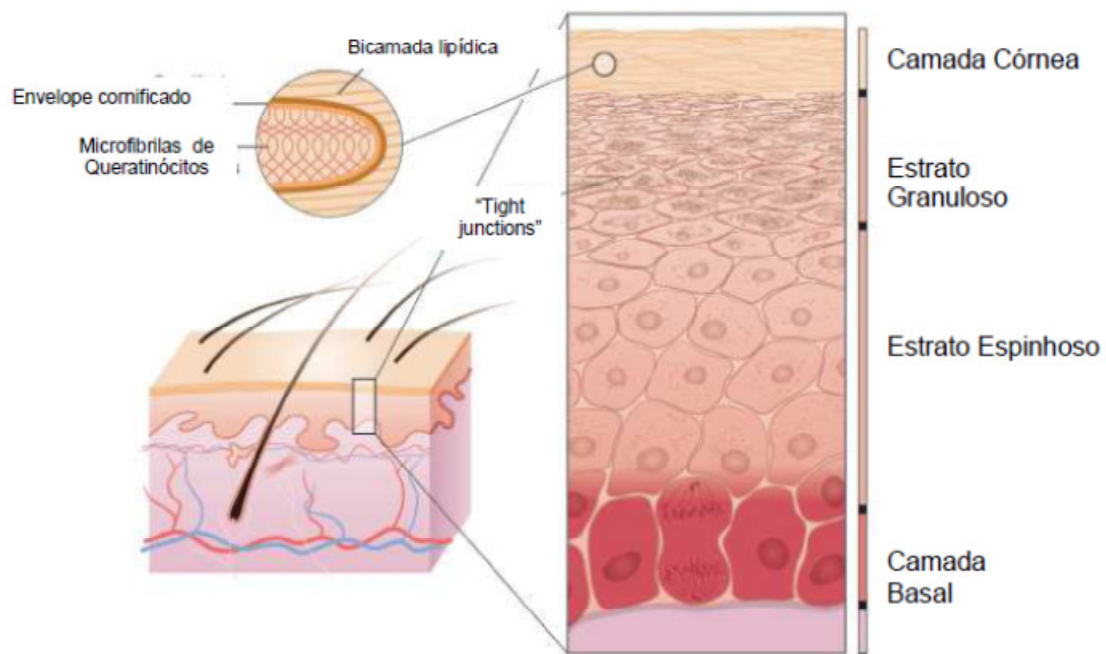


Figura 02 Esquema simplificado de uma seção transversal da epiderme. Fonte: Adaptado de SEGRE, J. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n. 5, p. 1150-1158, 2006.

Na epiderme estão presentes múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias, como os queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans (FREINKEL e WOODLEY, 2001). As células mais importantes para a manutenção da integridade estrutural da epiderme são os queratinócitos, os quais são também responsáveis pela formação do epitélio estratificado pavimentoso. A camada basal da epiderme, denominada epitélio germinativo, é constituída por células que se multiplicam continuamente, de maneira que as novas células geradas empurram as mais velhas para cima, em direção à superfície. À medida que envelhecem, as células epidérmicas tornam-se achatadas, e passam a sintetizar e a acumular queratina, uma proteína resistente e impermeável. Quando atingem a superfície, os queratinócitos transformam-se em um invólucro morto de queratina, formando uma barreira física denominada camada córnea (MONTAGNA e PARAKKAL, 1974).

Logo acima da camada basal está o estrato espinhoso, onde os queratinócitos são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina (queratinização) que interagem com os desmossomas, síntese de agentes antioxidantes (glutathione redutase, peroxidase, catalase), citocinas, quimiocinas, queratohialina, entre outras funções (ROSS *et al.*, 1993; NORRIS, 2004). O estrato granuloso, situado acima do

estrato espinhoso, é a camada onde se inicia o processo de cornificação, as células sofrem apoptose diferenciando-se em corneócitos. Logo acima do estrato granuloso está a camada córnea, a qual atua como uma grande barreira contra a penetração de organismos externos e toxinas, além de prevenir a perda de água. (ROSS *et al.*, 1993; NORRIS, 2004).

Os queratinócitos têm um importante papel, na fase de proliferação celular da camada basal, durante o desenvolvimento do processo inflamatório. A função e a morfologia destas células são modificadas notavelmente, e elas migram até a camada superficial da região lesada. Inúmeras proteínas e enzimas são liberadas para facilitar a migração e outras funções celulares, e reconstituir a epiderme lesada e a membrana basal. Durante o processo inflamatório ocorre também a formação do tecido de granulação e reconstituição da matriz dérmica, fibroplasia pelos fibroblastos e angiogênese pelas células endoteliais (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

Os melanócitos são células que ocupam 10 a 13% da epiderme, localizados mais especificamente na camada basal. São células responsáveis pela produção de melanina, proteína responsável pela coloração da pele e proteção contra a radiação UV (FITZPATRICK *et al.*, 1979; HAASS e HERLYN, 2005). As células de Langerhans são células presentes na epiderme responsáveis pelo reconhecimento, captação, processamento e apresentação de antígenos solúveis e haptenos aos linfócitos T. As células de Merckel, por sua vez, são células neuroendócrinas presentes tanto na epiderme quanto na derme, que atuam como mecanoreceptores e também contribuem para o desenvolvimento do plexo nervoso na porção superior da derme (HAAKE *et al.*, 2001).

1.2 INFLAMAÇÃO CUTÂNEA

A pele é passível de ser atingida pelos fenômenos patológicos básicos, como qualquer outro órgão (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). Ela tem um papel importante de proteção, termorregulação, resposta imunológica, bem como na manutenção e desenvolvimento de defesa. Por estar na interface com o meio externo, a pele está constantemente sujeita a estímulos externos, tais como patógenos, agentes mecânicos, agentes químicos e agentes físicos (BECKER, 1997; FIRESTEIN, 2004).

Uma das respostas de proteção do organismo é a inflamação (FIRESTEIN, 2004), que ocorre por uma sequência de eventos complexos desencadeados por uma variedade de estímulos externos (FIRESTEIN, 2004). A finalidade do processo inflamatório é evitar disseminação dos agentes agressores a outras regiões do

organismo, assim como erradicá-los e assim limitar a alteração do local de sua incidência, além de tentar restabelecer a homeostase da pele e promover o reparo tecidual (BECKER, 1997; KUSHNER, 1998; FIRESTEIN, 2004).

O processo de reparação tecidual é iniciado imediatamente após ocorrer uma lesão, inicia-se com a liberação de vários fatores de crescimento e compostos de baixo peso molecular, provenientes do soro, de vasos sanguíneos lesionados e da ativação de plaquetas degranuladas (MARTIN, 1997; WERNER e GROSE, 2003).

As plaquetas são as primeiras a atuar no processo inflamatório, elas formam o coágulo e também liberam fatores quimiotáticos que atraem outras plaquetas, leucócitos e fibroblastos para área lesada (FREINKEL e WOODLEY, 2001). Entre os fatores liberados encontram-se fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante (TGF)-beta, fator ativador de plaquetas, entre outros. Estes fatores de crescimento são fundamentais para estimular a quimiotaxia de leucócitos para o local da lesão (BRIGATI *et al.*, 2002; COUSSENS e WERB, 2002). Os leucócitos, especificamente os neutrófilos e macrófagos dão continuidade a fase inflamatória (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

Os neutrófilos são atraídos poucos minutos após a lesão, e contribuem para a defesa contra micro-organismos por realizar fagocitose e liberar proteinases e espécies reativas de oxigênio (BRIGATI *et al.*, 2002; COUSSENS e WERB, 2002). Através do processo de fagocitose, os neutrófilos são capazes de debelar bactérias e retirar os restos celulares (FREINKEL e WOODLEY, 2001). Além disso, são uma importante fonte de citocinas e quimiocinas as quais são necessárias para o recrutamento, ativação e diferenciação celular (BRIGATI *et al.*, 2002; COUSSENS e WERB, 2002), sendo então responsáveis pelo controle da resposta inflamatória (MUELLER, 2006).

Após o recrutamento dos neutrófilos, que atingem um número máximo e então entram em declínio, os monócitos / macrófagos são recrutados para o local de lesão. Essas células contribuem para a remodelação da matriz extracelular (MEC), e para a angiogênese por liberarem proteases secretoras tais como metaloproteases de matriz (MMPs) e uroquinase inibidora de plasminogênio (UPA) e componentes de MEC, tais como trombospondina-1 (DIPIETRO, 1995; COUSSENS e WERB, 2002).

Em seguida, ocorre a atuação dos mastócitos, outro grupo celular que atua no sistema imunológico inato. Essas células contribuem para a resposta inflamatória após a lesão tecidual através da liberação de MMPs e proteases de serina, heparina e

heparanase, bem como vários fatores de crescimento como fatores de crescimento bFGF e vascular endotelial (VEGF) (GRÜTZKAU *et al.*, 1998).

A interação complexa entre células e mediadores inflamatórios produz e mantém o processo inflamatório. Mediadores pró-inflamatórios são liberados no foco inflamatório, como substância P, prostaglandinas, leucotrienos, histamina, serotonina, interleucinas e interferons (NICKOLOFF e NESTLE, 2004).

Durante o processo inflamatório normal, como por exemplo durante a cicatrização de uma ferida, a resposta inflamatória ocorre de forma rápida, porém é auto-limitada. A desregulação de qualquer um dos fatores que atuam na resposta inflamatória pode levar a anormalidades e, em alguns casos, levar à patologias. O perfil e nível de citocinas/quimiocinas que persiste em locais de inflamação é importante no desenvolvimento de algumas patologias (MUELLER, 2006).

Um exemplo desta desregulação ocorre em condições de inflamação e cicatrização hipertrófica, onde há um aumento da proliferação e da atividade dos fibroblastos devido a ação de alguns mediadores pró-inflamatórios incluindo IL-1 α e IL-1 β (FREINKEL e WOODLEY, 2001). Outro exemplo é uma desregulação no processo de proliferação dos queratinócitos, pois possíveis distúrbios no crescimento dessas células podem ser responsáveis pela patogênese de diversas doenças de pele, como por exemplo, psoríase, lesões crônicas e câncer de pele (GNIADCKI, 1998).

A psoríase é uma das doenças de pele de maior incidência (SEELIGER *et al.*, 2003; VAN DE KERKHOF *et al.*, 2008), que afeta aproximadamente 2% da população (SCHÖN e BOEHNCKE, 2005). Ela promove um impacto na qualidade de vida do paciente, pois além de causar as lesões na pele, pode gerar também situações de embaraço, medo, depressão, problemas de auto-estima devido ao aspecto que as lesões assumem. Esses sentimentos afetam diretamente todos os aspectos da vida, como o relacionamento pessoal, prática de esportes, sexualidade, cuidados pessoais e atividades no trabalho e na escola (SEELIGER *et al.*, 2003; VAN DE KERKHOF *et al.*, 2008).

A psoríase normalmente se manifesta através de placas avermelhadas e descamativas com as bordas bem delimitadas que aparecem principalmente nos cotovelos, joelhos, couro cabeludo e região lombar. A psoríase *vulgaris* é a forma mais comum, a qual pode se manifestar de forma moderada a severa variando de acordo com a área da superfície corporal envolvida e também com o impacto na qualidade de

vida do paciente. Aproximadamente 20% dos pacientes com psoríase desenvolvem artrite psoriática que é uma manifestação extracutânea da doença bastante debilitante (SCHÖN e BOEHNCKE, 2005), pois além de ser uma forma muito dolorosa, também pode causar deformações (GUDJONSSON e ELDER, 2007).

Embora o evento inicial da lesão psoriática ainda seja desconhecido, muitos fatores ambientais têm sido mostrados desempenhar um papel na patogênese da psoríase. Estímulos externos tais como trauma físico, infecções, estresse, drogas, álcool e fumo podem desencadear um episódio inicial de psoríase em indivíduos que possuem uma predisposição genética (BOWCOCK e KRUEGER, 2005).

Dado o início da lesão, as principais características da doença são hiperproliferação dos queratinócitos com diferenciação anormal levando a um defeito na formação e na função de barreira, alterações vasculares e infiltração de células inflamatórias (CALS-GRIERSON e ORMEROD, 2004). As placas psoriáticas apresentam escamas na superfície, que são ocasionadas pela diferenciação terminal alterada dos queratinócitos. Na epiderme, a camada granular é o local onde começa a diferenciação terminal, porém, quando há lesões psoriáticas, ela é severamente reduzida ou até mesmo está ausente. Consequentemente, o estrato córneo na pele psoriática é formado de queratinócitos que não estão completamente diferenciados e que erroneamente apresentam células nucleadas, formando as paraqueratose. Outra característica histológica da psoríase inclui a presença de neutrófilos em pequenos focos dentro do estrato córneo e significativa infiltração de mononucleares na epiderme (LOWES *et al.*, 2007).

Por suas características proliferativas, achava-se que a origem da doença estava nos queratinócitos, e que a inflamação era apenas uma consequência. Porém, tem-se demonstrado que as alterações proliferativas nos queratinócitos são consequências dos fenômenos inflamatórios (GORDON e MCCORMICK, 2003; ARRUDA *et al.*, 2004; GOTTLIEB, 2005).

Os fenômenos inflamatórios desencadeiam alterações proliferativas nos queratinócitos, mediadas por linfócitos T. A ativação dos linfócitos T ocorrem após uma série de estímulos que começam nos tecidos periféricos, em resposta a uma lesão, e uma vez ativadas, se multiplicam e se dividem, passando a realizar o papel de células T efectoras de memória (GORDON e MCCORMICK, 2003; ARRUDA *et al.*, 2004; GOTTLIEB, 2005).

Inicialmente ocorre a ativação das células do sistema imune inato, como as células dendríticas e os queratinócitos. Essa ativação é desencadeada por vários fatores ambientais já citados. Como exemplo temos o trauma mecânico, que pode ativar os queratinócitos, os quais passam a liberar citocinas (IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF)- α) e algumas proteínas. As citocinas e proteínas liberadas ativam as células dendríticas na epiderme e na derme. A ligação de antígenos de agentes infecciosos aos receptores *toll like* nas células dendríticas e os queratinócitos, também pode levar a ativação dessas células. As células dendríticas e os queratinócitos ativados produzem inúmeras quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento (GUTTMAN YASSKY e KRUEGER, 2007; LOWES *et al.*, 2007).

Uma vez ativada, a célula dendrítica processa um antígeno (ambiental ou endógeno, ainda não definido), e migra para o linfonodo, onde apresenta o antígeno formado aos linfócitos T (NICKOLOFF e NESTLE, 2004). Um desses antígenos pode ser um auto-peptídeo de reação cruzada para estreptococos, porque infecções estreptocócicas precedem a psoríase em mais de 90% dos pacientes com psoríase tipo I (VALDIMARSSON *et al.*, 1995; WEISENSEEL *et al.*, 2002). Para que a ativação do linfócito T ocorra, é necessária a ligação do antígeno, que está acoplado à molécula do complexo de histocompatibilidade principal na membrana da célula dendrítica, ao receptor de membrana do linfócito T. É necessária também para esta ativação, a ligação de proteínas da membrana plasmática da célula dendrítica (ICAM-1; LFA-3; CD80/CD86) com as proteínas da membrana do linfócito T (respectivamente LFA-1; CD2; CD28) (NICKOLOFF e NESTLE, 2004). Portanto, a ativação dos linfócitos T é suscetível de ser controlada por uma ampla variedade de células dendríticas apresentadoras de antígenos que também aumentam na pele (LOWES *et al.*, 2007).

Os linfócitos T ativados, migram para a pele onde induzem, juntamente com as células dendríticas e outras células, a formação de uma placa principal psoriática. Durante esta etapa, alguns linfócitos T e células dendríticas começam a migrar para a epiderme e liberam citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez, estimulam os queratinócitos e as mudanças típicas da epiderme (BOWCOCK e KRUEGER, 2005). Além da ativação de células apresentadoras de antígenos, ocorre a ativação e aumento de células T auxiliares (Th)-1 e Th-17 (DAVIDOVICI *et al.*, 2010). Muitas das moléculas inflamatórias produzidas na psoríase são fortemente reguladas pelas células Th-1 e Th-17, como o interferon (IFN) γ , IL-17 e IL-22, as quais induzem um

conjunto característico de produtos inflamatórios nos queratinócitos e outros tipos de células presentes em lesões cutâneas da psoríase (NOGRALES *et al.*, 2008).

Placas de psoríase são infiltradas por um elevado número de células imunes, incluindo linfócitos T, neutrófilos, mastócitos, macrófagos e células dendríticas. Na psoríase, a epiderme e a derme mostram um elevado número de células dendríticas, tais como células de Langerhans e células dendríticas dérmicas, uma subpopulação de células dendríticas intradérmica (GOTTLIEB *et al.*, 1986; WOLLENBERG *et al.*, 2002).

Na psoríase, algumas células dendríticas produtoras de TNF- α e da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), produzem também altas concentrações de IL-20, e outras moléculas inflamatórias (LOWES *et al.*, 2007). Estas células poderiam ser peça essencial para a inflamação “inata”, induzindo uma gama muito maior de moléculas inflamatórias nos queratinócitos ou em outras células pela ação do TNF e IL-20. O excesso de produção IL-1, IL-6, IL-8, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e numerosas quimiocinas podem ser provenientes desta via (NOGRALES *et al.*, 2008). Células dendríticas dérmicas isoladas da pele psoriática parecem possuir um poder auto-estimulatório, pois induzem a produção de IL-2 e IFN- γ por células T autólogas (NESTLE *et al.*, 1994).

Em geral, várias substâncias inflamatórias são produzidas nas lesões de pele causadas pela psoríase e muitas delas parecem ser liberadas para a circulação sistêmica em função da gravidade e extensão das lesões (LIU *et al.*, 2007). As citocinas inflamatórias estão em concentrações aumentadas tanto no sangue quanto na pele (DAVIDOVICI *et al.*, 2010), elas apresentam um importante papel na patogênese das doenças de pele, como exemplo o TNF (LEE *et al.*, 2009). Além disso, o tratamento eficaz da psoríase reduz os níveis de citocinas circulantes, como o TNF e IL-1 (ZABA *et al.*, 2007).

Os agentes imunossupressores são utilizados no tratamento destas afecções cutâneas e exercem seus efeitos via inibição da produção ou ação da IL-2 (ex.: tacrolimus, pimecrolimus, ciclosporina), inibição da expressão de genes de citocinas (ex.: glicocorticóides) e inibição da síntese de purinas ou pirimidinas (ex.: micofenolato de mofetila) (RANG *et al.*, 2007). Os imunomoduladores macrolactâmicos, como o pimecrolimus e o tacrolimus inibem seletivamente a ativação das células T e a síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-3, IL-4, IL-5 e IFN- γ). A terapia tópica com esses

agentes imunomoduladores já se mostrou efetiva em diversas condições dermatológica (SKINNER, 2005).

Os fármacos anticitocinas representam um dos maiores avanços no tratamento de doenças inflamatórias crônicas graves nos últimos anos (RANG *et al.*, 2007). O alvo desses fármacos são as moléculas de superfície das células T (ex.: Efalizumab e Alefacept) ou eles bloqueiam a ação de citocinas, como por exemplo agentes anti-TNF α (Etanercept), sendo efetivos no tratamento da psoríase e da dermatite de contato, com o uso já aprovado pelo FDA. No entanto, esses fármacos são anticorpos frutos da engenharia recombinante, assim o seu custo é elevado, o que limita seu uso (SIMMONS, 2006; WERTH, 2006; TAN *et al.*, 2007).

O sistema imune como alvo no tratamento de algumas condições dermatológicas e a compreensão do mecanismo de ação destes agentes permite a transição da terapia clássica com os glicocorticóides tópicos para a terapia com agentes imunomoduladores (NICKOLOFF e NESTLE, 2004). No entanto, os glicocorticóides ainda são os agentes anti-inflamatórios mais empregados no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, devido aos seus efeitos sobre a resposta imune e sua ação anti-inflamatória (CALOU *et al.*, 2008; LAM *et al.*, 2008).

Os glicocorticóides têm como principal efeito, inibir a expressão de uma série de genes inflamatórios incluindo genes de citocinas, enzimas, receptores e moléculas de adesão. Eles se ligam em receptores próprios e essa ação inibitória envolve além dos receptores, fatores de transcrição como o fator nuclear-kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1), sendo que estes regulam a expressão gênica de diversos componentes inflamatórios (FRY *et al.*, 2007). Os glicocorticóides restringem a proliferação clonal das células Th através da redução da transcrição gênica para IL-2, porém também interferem na transcrição de outras citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1, etc) (FOX, 2006).

Por este motivo, os glicocorticóides são extensamente utilizados para suprimir o processo inflamatório nas doenças crônicas que estão associadas com o aumento da expressão de genes inflamatórios (BARNES, 1998; CHI *et al.*, 2003). Porém, o uso contínuo dos glicocorticóides é freqüentemente acompanhado de efeitos adversos severos e muitas vezes irreversíveis, incluindo a atrofia cutânea, telangiectasias, hipertricose, alterações no processo de cicatrização, Síndrome de Cushing, entre outros (SCHÄCKE *et al.*, 2002; SCHOEPE *et al.*, 2006). Os anti-inflamatórios não

esteroidais não são usados no tratamento da psoríase, e em alguns casos podem até agravar a psoríase (FRY *et al.*, 2007).

Grande parte das doenças inflamatórias cutâneas ainda não possui sua etiologia e fisiopatologia bem definidas, como é o caso da psoríase, o que prejudica principalmente o tratamento dessas doenças. Os tratamentos terapêuticos disponíveis atualmente não são totalmente eficazes, sendo que aqueles que promovem melhoras no quadro do paciente promovem também uma gama de efeitos indesejáveis. Por esse motivo, a busca por novas estratégias que se mostrem seguras e eficazes em prevenir a formação de edema, o extravasamento plasmático e o recrutamento de mediadores inflamatórios é um caminho promissor para se encontrar terapias adequadas no combate de reações inflamatórias excessivas (SEELIGER *et al.*, 2003; MAN *et al.*, 2008). Uma alternativa interessante nessa busca por novas terapias seria a utilização de plantas medicinais.

1.3 PLANTAS MEDICINAIS

Há muito tempo, o homem já utilizava plantas como alimento e como medicamento (ALMEIDA, 1993). Com o decorrer do tempo o uso de plantas foi modificado nas diversas culturas e associado a outras práticas por influências ocorridas em cada momento histórico. Em muitos dos casos, os vegetais que eram utilizados preferencialmente como alimento em alguns países, transformaram-se em aliados no arsenal terapêutico em outras regiões (MARTINS *et al.*, 2000).

Um grande conhecimento popular foi formado como resultado da utilização de plantas de forma primitiva através da experimentação, tentativa e principalmente da observação, durante a realização do tratamento. Originou-se a fitoterapia, que é a forma de tratamento e prevenção de doenças que utiliza plantas. Estas plantas sintetizam, através de seu metabolismo primário, diversos nutrientes e metabólitos ativos e, através do metabolismo secundário, substâncias com ação farmacológica denominadas de princípios ativos (MARTINS *et al.*, 2000).

O vasto conhecimento popular em relação ao uso de plantas e produtos de origem animal em diversas enfermidades tem sido uma estratégia útil no desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais. Este tipo de informação permite guiar a pesquisa fitoquímica de produtos naturais na busca de novos agentes terapêuticos. Muitos dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado que são

derivados de produtos naturais provêm desta informação, definida como informação etnobotânica ou etnofarmacológica (CLARK, 2002).

Fontes de substâncias naturais, incluindo os compostos derivados de plantas, têm sido utilizadas como estratégia para obtenção de novos compostos biologicamente ativos. Assim, é incontestável a importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de fármacos. A descoberta da atividade biológica destas substâncias não representou apenas o surgimento de grupos novos de medicamentos, mas possibilitou a identificação de novas intervenções terapêuticas. Antes do isolamento e estudo da atividade da cocaína, da tubocurarina e da atropina, não se conheciam anestésicos locais, bloqueadores musculares e anticolinérgicos, respectivamente, entre outras categorias terapêuticas (BRUNETON, 1993; CALIXTO *et al.*, 2001).

Como exemplo de uma classe de fármacos com fins terapêuticos, desenvolvidos a partir de produtos naturais, destaca-se a dos anti-inflamatórios. Muitos metabólitos secundários derivados de plantas são conhecidos por atuarem direta ou indiretamente em moléculas ou interferirem no mecanismo de ação de: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios), produção e ação de segundos mensageiros (cGMP, cAMP, proteínas quinases, cálcio), expressão dos fatores de transcrição (AP-1, NF- κ B, proto-oncogenese – c-jun, c-fos e c-myc), expressão de moléculas pró-inflamatórias (iNOS, ciclooxigenase (COX)-2, IL-1 β , TNF- α , neuropeptídeos e proteases) (CALIXTO *et al.*, 2003).

As plantas na medicina popular, por suas propriedades terapêuticas, adquiriram fundamental importância (MARTINS *et al.*, 2000). No Brasil, onde existem cerca de 120.000 espécies de plantas superiores, os indígenas usaram e ainda utilizam vários vegetais para o tratamento de seus males ou como veneno em suas guerras e caçadas (SARTI e CARVALHO, 2004). Principalmente pela extensa e diversificada flora, riquíssima em exemplares, o uso de plantas medicinais sempre foi significativo, fazendo parte da cultura popular brasileira (DANTAS *et al.*, 2000).

Nesse contexto, o interesse pelas plantas medicinais permanece forte, pois permite o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de diversas doenças, incluindo aquelas que acometem a pele. Considerando também que os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento de várias dermatoses (psoríase, dermatite atópica, eczemas, etc), como os anti-inflamatórios não-esteroidais, anti-histamínicos,

glicocorticóides e imunossupressores, muitas vezes não apresentam a eficácia desejada, além de promoverem efeitos adversos que limitam seu uso (CLARK, 2002; FIRESTEIN, 2004).

Cerca de 300 preparações de plantas medicinais destinadas ao tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, tiveram sua eficácia comprovada e seu uso tradicional validado pela Comissão E (Corpo Científico Responsável pela Validação de Plantas Medicinais na Alemanha), sendo que 40 são destinadas ao uso na dermatologia e 10 plantas têm papel significativo na prática terapêutica, nas quais estão incluídas a *Arnica montana*, *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita*, *Echinacea sp.*, *Sanguinária canadenses*, *Hammamelis virginiana*, *Aveno sativa*, *Aloe Vera* e *Hypericum perforatum* (BEDI e SHENEFELT, 2002; DATTNER, 2003; MEYER *et al.*, 2005). Estas plantas são largamente utilizadas pela população para o tratamento de inflamações cutâneas, sendo sua eficácia e segurança comprovadas através de estudos científicos pré-clínicos e clínicos (BEDI e SHENEFELT, 2002).

No entanto, grande parte das plantas utilizadas na medicina tradicional ainda não foram estudadas de modo a comprovar sua eficácia e segurança e seu uso popular não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros. Apesar de serem plantas medicinais, não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e a preconização ou autorização oficial do seu uso como medicamento, devem estar fundamentadas em evidências experimentais (LAPA *et al.*, 2000).

1.4 *Combretum leprosum*

Combretum leprosum (Figura 3) é uma espécie melífera encontrada nos estados das regiões norte e nordeste do Brasil e também nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (MARINHO *et al.*, 2002; CHAVES *et al.*, 2007). Popularmente, é conhecida pelos nomes de mofumbo, cipoaba e carne-de-vaca. A espécie é utilizada como planta medicinal com função cicatrizante, na prevenção de irritações cutâneas e na limpeza de feridas, na contenção de hemorragias, como sedativo (PIETROVSKI *et al.*, 2006), antitussígeno e expectorante (AGRA *et al.*, 2007).

Esta planta pertence à família Combretaceae que consiste em 18 gêneros, dos quais o maior é o *Combretum* possuindo aproximadamente 370 espécies. Comumente utilizadas com propósitos medicinais, essas espécies estão amplamente distribuídas em diversas partes da África onde muitas vezes representam as espécies mais

abundantes, podendo ser encontrados como árvores, arbustos ou trepadeiras. Os principais usos dessas plantas, em algumas regiões da África, são para o tratamento de doenças infecciosas como diarreia, gripe, sífilis e gonorréia, febre, dores musculares, hipertensão e edema, sendo que algumas espécies como *C. zeyheri* são utilizadas para tratar também tumores estomacais. Para o seu uso, essas plantas são geralmente preparadas como decocções ou infusões a partir da planta seca ou, mais raramente, das folhas frescas. Essas espécies são ainda utilizadas no tratamento tópico de feridas e infecções na pele, em forma de pomadas adicionadas da matéria vegetal seca. Geralmente são utilizadas as folhas e raízes, sendo que os frutos são evitados devido sua aparente toxicidade em humanos (MCGAW *et al.*, 2001; FYHRQUIST, 2007).

As espécies do gênero *Combretum* estão sendo muito pesquisadas, e seus estudos já proporcionaram o isolamento e identificação de diversos compostos com propriedades biológicas conhecidas, como taninos, flavonóides, saponinas, cumarinas, triterpenos, derivados do ácido elágico, glicosídeos antracênicos e derivados de fenantreno. Esses compostos são, provavelmente, os responsáveis pelas diversas propriedades biológicas comprovadas em pesquisas (FYHRQUIST, 2007).

|

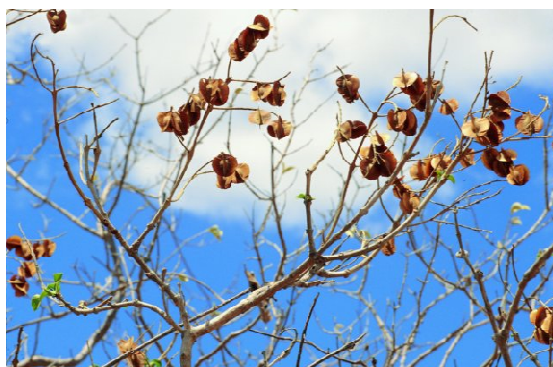


Figura 03: Imagens da *Combretum leprosum* (Mofumbo) Fonte: CNIP/APNE (2011).

Já foram evidenciadas, em trabalhos recentes, propriedades antimicrobianas, citotóxicas e antiproliferativas referentes aos extratos e também aos compostos isolados. Angeh e colaboradores (2007) demonstraram que triterpenos isolados do extrato das folhas de *Combretum imberbe* apresentaram forte atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; atividade anti-inflamatória e também, uma moderada atividade anti-proliferativa e citotóxica contra células das linhagens K-562, L-929 e HeLa.

Outros estudos foram conduzidos no intuito de verificar possíveis atividades biológicas do glicosídeo ácido móllico isolado de *Combretum molle*. Esses estudos, além de demonstrarem a capacidade dos compostos de causar bradicardia,

hipotensão e vasodilatação dependente do endotélio em ratos, demonstraram também que o composto apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica em modelos de edema de pata, contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste de placa quente (OJEWOLE, 2008a; 2008b).

Foram isolados, das folhas e raízes de *Combretum leprosum*, ácido arjunólico, ácido móllico, ácidos graxos, triterpeno, flavonóides glicosilados 3-O-metilquercetina e quercetina. A análise do extrato etanólico das folhas, demonstrou que os monossacarídeos são os principais componentes (80%), os triterpenos representam 10%, estando entre eles o ácido arjunólico que é um triterpeno pentacíclico. O extrato ainda contém 5% de oligossacarídeos e 3% de ácidos graxos (FACUNDO *et al.*, 1993; FACUNDO *et al.*, 2005).

Existem poucos estudos envolvendo a investigação das atividades biológicas de *C. leprosum*, e eles apontam para ações semelhantes aquelas observadas em outras espécies do gênero. Facundo e colaboradores (2005) demonstraram em seu estudo que tanto o extrato das raízes de *C. leprosum* como o composto isolado, ácido arjunólico, apresentaram atividade anti-inflamatória quando administrados por via oral, ao reduzir o edema de pata induzido por carragenina. O ácido arjunólico, também administrado por via oral, foi ainda capaz de reduzir o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico (AA), entretanto não alterou o edema de orelha formado pela aplicação tópica do éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), sugerindo que o composto estaria atuando ao influenciar a via de metabolismo do AA pela ação da enzima COX. No mesmo estudo, foi verificado que o extrato das raízes de *C. leprosum* foi capaz de inibir a atividade das enzimas butiril e acetilcolinesterase, sendo comprovado ainda que o responsável por essa ação é o ácido arjunólico presente no extrato. Outro trabalho avaliou também a atividade do extrato etanólico das cascas da planta num modelo de úlcera induzida por indometacina, onde o extrato demonstrou possuir princípios ativos com atividade protetora da mucosa gástrica (MENESES *et al.*, 2003).

O trabalho de Medeiros e colaboradores (2003) verificou a ação analgésica do extrato etanólico das raízes de *C. leprosum*. Tanto o extrato quanto o ácido arjunólico foram capazes de reduzir contorções abdominais induzidas por ácido acético. Foi demonstrada também atividade ansiolítica, após estudos preliminares com o extrato hidroalcoólico das cascas da espécie quando administrado por via oral, e atividade depressora central e relaxante muscular quando administrado por via intraperitoneal (ALMEIDA *et al.*, 2003).

Pietrovski e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antinociceptiva do extrato etanólico das flores de *C. leprosum* e observaram que o extrato foi capaz de inibir a nocicepção provocada em diferentes modelos como a hiperalgesia visceral provocada por ácido acético, a hiperalgesia por calor na placa quente, e ainda, hiperalgesia neurogênica e inflamatória, nos modelos com formalina, capsaicina e glutamato (PIETROVSKI *et al.*, 2006).

O extrato etanólico das flores de *C. leprosum* também apresentou atividade anti-inflamatória tópica, quando testado em diferentes modelos de inflamação em camundongos. Entre os modelos já testados, destaca-se a capacidade de inibir diversos parâmetros inflamatórios verificadas no modelo de inflamação crônica, como migração de mononucleares, formação de edema e hiperproliferação epidérmica (DA SILVA, 2009). O PelleC1, é um composto presente no extrato das flores da *C. leprosum*, sendo que sua atividade precisa ser avaliada para verificar se este composto é o responsável, ou atua de alguma forma, para que o este extrato etanólico tenha atividade anti-inflamatória tópica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito anti-inflamatório tópico do composto PelleC1, isolado da planta *Combretum leprosum*, em modelo de inflamação crônica na pele de camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do tratamento tópico crônico com o composto PelleC1 no modelo de edema de orelha causado por múltiplas aplicações de TPA;
- Investigar a ação do tratamento com o composto PelleC1 sobre a migração de leucócitos (neutrófilos e monócitos) nos animais submetidos ao modelo de indução de edema por múltipla aplicação de TPA;
- Analisar histologicamente a ação do tratamento crônico com o composto PelleC1 na pele com inflamação induzida por múltiplas aplicações de TPA;
- Avaliar o efeito do tratamento tópico com o PelleC1 sobre a proliferação celular na epiderme pela quantificação do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) no tecido por marcação histoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO COMPOSTO PELLEC1 ISOLADO DA *Combretum leprosum*

A obtenção do extrato etanólico das flores, assim como o isolamento, a purificação e a identificação do composto isolado de *C. leprosum* foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Alves Facundo do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de Rondônia.

3.2 ANIMAIS

Os procedimentos foram realizados em camundongos Swiss fêmeas pesando entre 25 e 35 g provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n = 5 por grupo) mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12/12 h e com livre acesso a água e ração comercial. Os animais foram mantidos na sala de experimentação durante pelo menos 1 h antes da realização dos experimentos para adaptação. Todos os experimentos com animais foram realizados após a aprovação dos protocolos experimentais pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) da Universidade Federal do Paraná sob o protocolo nº 296.

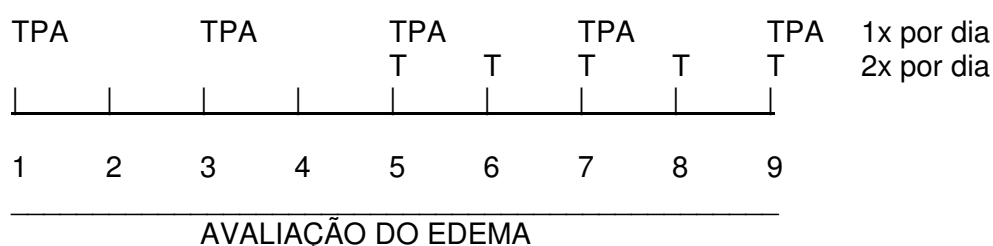
3.3 PROTOCOLO ANIMAL

O processo inflamatório crônico foi induzido na orelha direita dos animais pela aplicação múltipla de TPA (2,0 µg/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 composto PelleC1 (0,3 mg/orelha) e a dexametasona (0,05 mg/orelha, controle positivo), começaram a ser administrados a partir do 5º dia de experimento 2 vezes ao dia (12 h/12 h) por via tópica. A dose de 0,3 mg/orelha de PelleC1 foi definida por dados preliminares obtidos em experimentos anteriores.

O edema de orelha é expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos. A espessura da orelha foi medida antes do início do experimento e após a indução do processo inflamatório, diariamente, utilizando um micrômetro digital (Great MT – 04513). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha

dos camundongos e a sua espessura registrada em micrômetros (mm). Para minimizar variações concernentes à técnica, as medições foram realizadas por um único experimentador. O TPA e a dexametasona foram dissolvidos em 20 µL de acetona e aplicados na orelha direita de cada camundongo, e o PelleC1 foi dissolvido em 20 µL de solução de álcool e acetona 1:1 (v:v).

No 9º dia do experimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e amostras de tecido das orelhas (círculos de 6 mm) foram coletadas, pesados e submetidos ao ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) (n = 5), e também para posteriormente ser realizada a avaliação histológica e imunohistoquímica (antígeno nuclear de proliferação celular - PCNA) (n = 5). O desenvolvimento do experimento foi realizado conforme o esquema mostrado na figura 04.



Legenda: TPA = indução de edema com TPA; T = dias de tratamento

3.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da enzima mieloperoxidase representa um indicativo indireto da presença de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no tecido. Para a avaliação da enzima mieloperoxidase foi empregada a metodologia de Bradley e colaboradores (1982), modificada por De Young e colaboradores (1989). As amostras (círculos de 6 mm do tecido) das orelhas de camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA, foram pesadas e adicionadas a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM em pH 5,4, contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizadas por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram colocadas em microtubos e centrifugadas a 11.200 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente foram adicionados 200 µL

de uma mistura contendo 100 μL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5.4, 85 μL de PBS 0,22M em 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 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 30 μL de acetato de sódio 1,46 M com pH 3.0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Microplate reader EL 808) com comprimento de onda de 630 nm, sendo expressa em mDO/Biópsia.

3.5 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG

A atividade da enzima NAG é utilizada como indicativo indireto da presença de leucócitos mononucleares. A atividade da NAG foi avaliada no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA, utilizando metodologia de Sanchez e Moreno (1999). As amostras (círculos de 6 mm de tecido) foram pesadas e adicionadas a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM em pH 5,4 contendo 0,5% de HTBA e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado 0,75 mL do tampão fosfato, anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram colocadas em microtubos e centrifugadas a 11.200 x g a 4°C por 20 min. Triplicatas de 25 μL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente adicionado 100 μL de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 μL de p-nitrofenil-acetamida- μ -D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido em água miliQ. Em seguida a placa foi incubada a 37°C por 1 hora e a reação interrompida pela adição de 30 μL de acetato glicina 200 mM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas (Bio-Tek Microplate reader EL 808) na absorbância de 405 nm e expressa em mDO/Biópsia.

3.6 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, emblocadas em parafina. Os blocos foram seccionados em cortes de 5 μm e esticados em lâminas. Os cortes foram hidratados em xilol, seguido por sequência decrescente em diferentes concentrações de etanol, finalizando com

coloração em hematoxilina e eosina. Para avaliar a espessura da epiderme os cortes foram fotografados em um aumento de 100x e 200x e as fotografias analisadas com o programa ImageJ® versão 1,41 (Instituto Nacional de Saúde, EUA). A espessura da epiderme foi avaliada em 5 regiões ao longo de cada imagem, sendo a média das medidas expressas em μm .

3.7 MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARA 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 desparafinadas 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 400x. 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).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M.. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do 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, São Diego, Califórnia, EUA.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO PELLEC1 NO AUMENTO DA ESPESSURA DA ORELHA INDUZIDO PELA MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA

A aplicação tópica do TPA causou aumento na espessura da orelha dos animais no primeiro dia após a indução, sendo que esta resposta reduz no segundo dia, mas no terceiro dia o edema fica semelhante ao primeiro dia e estabiliza até o final do experimento (9º dia). O tratamento com o PelleC1 (a partir do 5º dia) foi capaz de causar redução significativa do edema detectada a partir do 6º dia de experimento ($38,12 \pm 6,89\%$) e este efeito foi intensificado no decorrer do experimento até o ultimo dia (9º dia, redução de $62,44 \pm 6,34\%$), quando comparado com o grupo controle. Como esperado, os animais tratados com a droga utilizada como controle positivo, dexametasona, também tiveram uma redução no edema induzido pelo TPA do 6º ao 9º dia. Importante destacar que o perfil de redução do edema apresentado pelo composto foi semelhante ao do corticóide dexametasona. O grupo que recebeu apenas o veículo (acetona) durante os nove dias não apresentou nenhuma alteração na espessura da orelha (Figura 04).

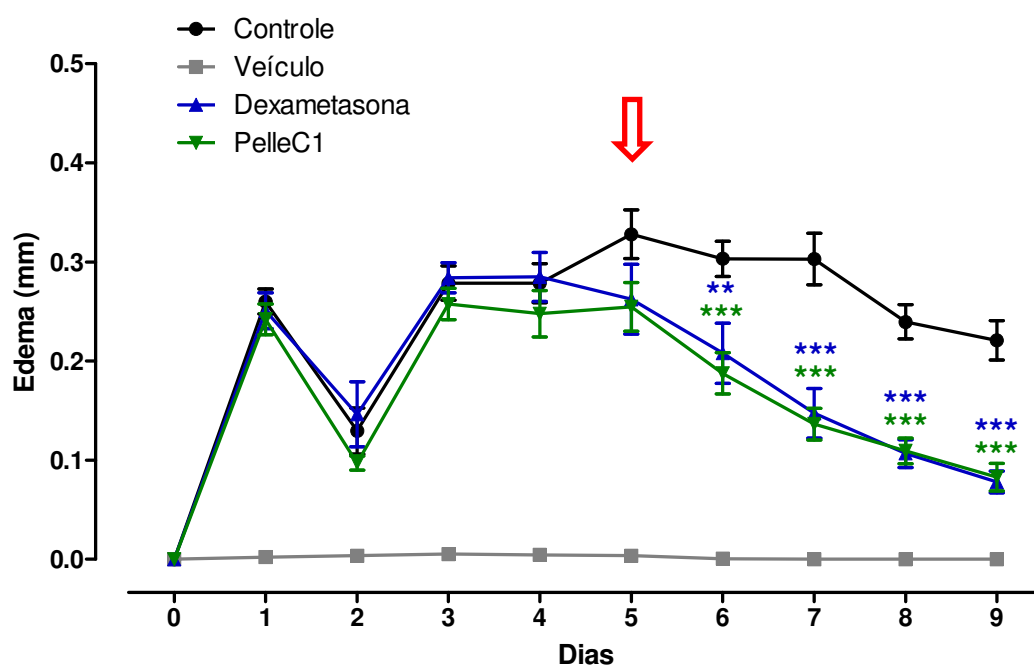


Figura 04: Efeito do PelleC1 (0,3 mg/orelha, tópico, 2 x dia), dexametasona (0,05 mg/orelha, tópico, 2 x dia), veículo (20 µL de acetona) no edema de orelha induzido por múltiplas aplicações do TPA (2,0 µg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia de experimento. Os pontos representam a média, e as barras verticais o E.P.M. de 13-17 animais. A análise estatística foi verificada pela análise de variância

(ANOVA) seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls. $**P<0,01$ e $***P<0,001$ foram indicativos de significância quando comparados aos grupos controle.

4.2 EFEITO DO PELLEC1 NO PESO DAS ORELHAS APÓS A MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA

Ao final do experimento, no 9º dia, após as repetidas aplicações do agente flogístico, foi observado um aumento significativo no peso das orelhas dos camundongos do grupo controle ($24,03 \pm 1,65$ mg) se comparados com o grupo naïve ($10,18 \pm 0,33$ mg)(animais não tratados) e grupo veículo ($10,64 \pm 0,43$ mg) (tratados com acetona). O grupo de animais tratados com o PelleC1 (0,3 mg/orelha) e com a dexametasona (0,05 mg/orelha), tiveram uma redução significativa de $52,34 \pm 5,13\%$ e $53,57 \pm 3,12\%$, respectivamente, no peso das orelhas quando comparados com o grupo controle (Figura 05).

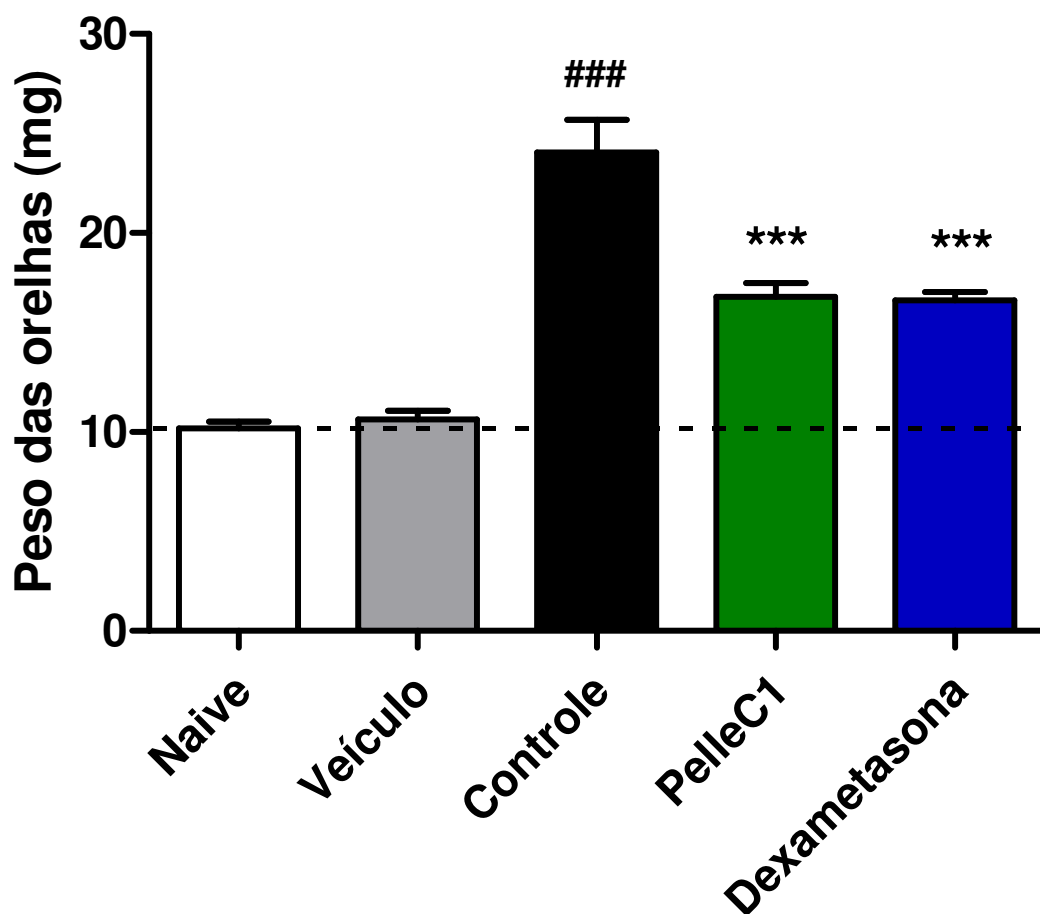


Figura 05 Efeito do PelleC1 (0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) no peso das orelhas no 9º dia após múltiplas aplicações de TPA (2,0 µg/orelha). Os dados apresentados representam a média $\pm$ E.P.M. de 10 animais. A análise estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupos controle. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo.

4.3 EFEITO DO PELLEC1 A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO

A determinação da MPO indica indiretamente a infiltração leucocitária, pois é um marcador de leucócitos PMN. Quando analisado no último dia do experimento as várias aplicações de TPA promoveram um aumento significativo na atividade da MPO no grupo controle ($0,29 \pm 0,01$ DO/Biópsia), se comparados com os grupos naive ($0,18 \pm 0,01$ DO/Biópsia) e veículo ($0,18 \pm 0,01$ DO/Biópsia). No grupo que recebeu indução do agente flogístico e depois tratado com PelleC1, foi verificado diminuição no aumento da atividade da MPO de $31,45 \pm 4,59\%$, comparando com o grupo controle.

Além disso, no grupo tratado com dexametasona também ocorreu redução na atividade da MPO em $67,01 \pm 2,0\%$ (Figura 06).

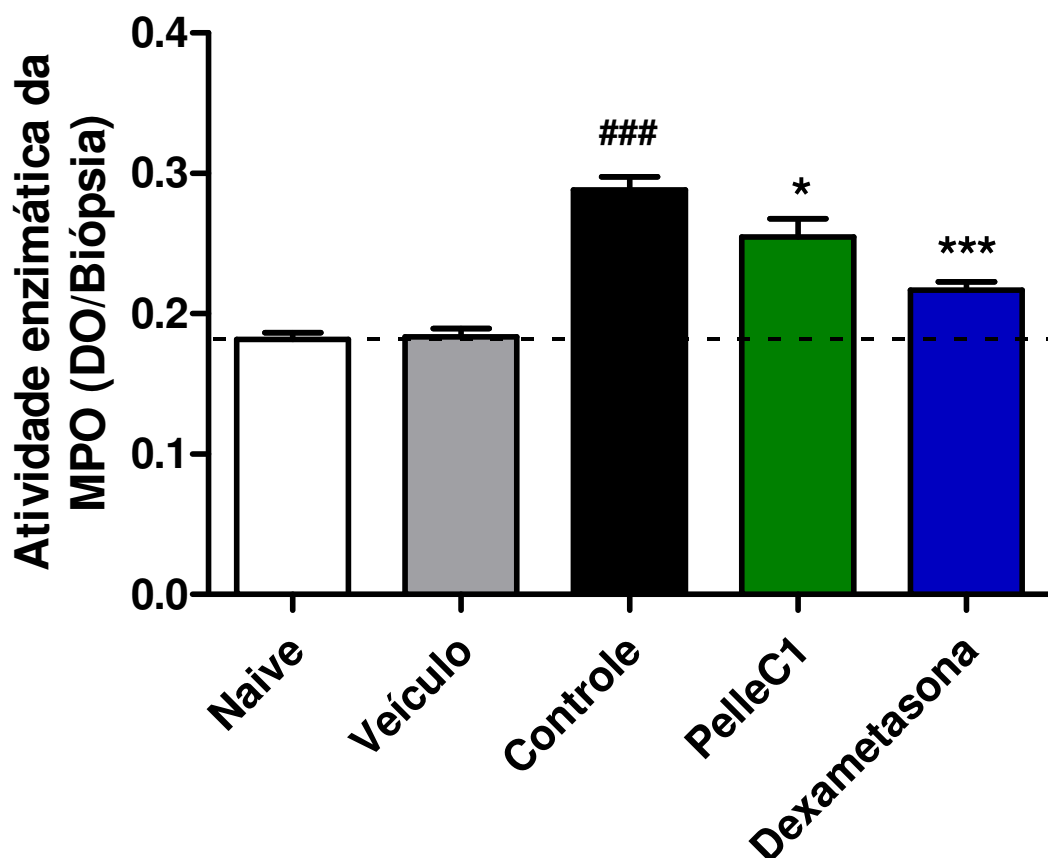


Figura 06 Efeito do PelleC1 (0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase em homogenato de orelhas após múltipla aplicação de TPA. A atividade enzimática foi avaliada no 9º dia após indução com múltipla aplicação de TPA. Todos os dados apresentados são média $\pm$ E.P.M. de 5 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA), seguidas pelo teste de post-hoc de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo.

4.4 EFEITO DO PELLEC1 SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG

A atividade enzimática da NAG é usada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido. Os resultados apresentados na figura 07 mostram que a múltipla aplicação do TPA induziu aumento na atividade da NAG na pele da orelha do grupo controle ($1,73 \pm 0,06$ DO/Biópsia) quando analisada no último dia do experimento (9º dia) e comparada aos grupos naive ($0,81 \pm 0,05$ DO/Biópsia) e (veículo $0,83 \pm 0,05$ DO/Biópsia). As orelhas tratadas com PelleC1 ou com dexametasona tiveram diminuição respectivamente de $39,31 \pm 0,64\%$ e $15,26 \pm 2,69\%$ na atividade da NAG (Figura 07).

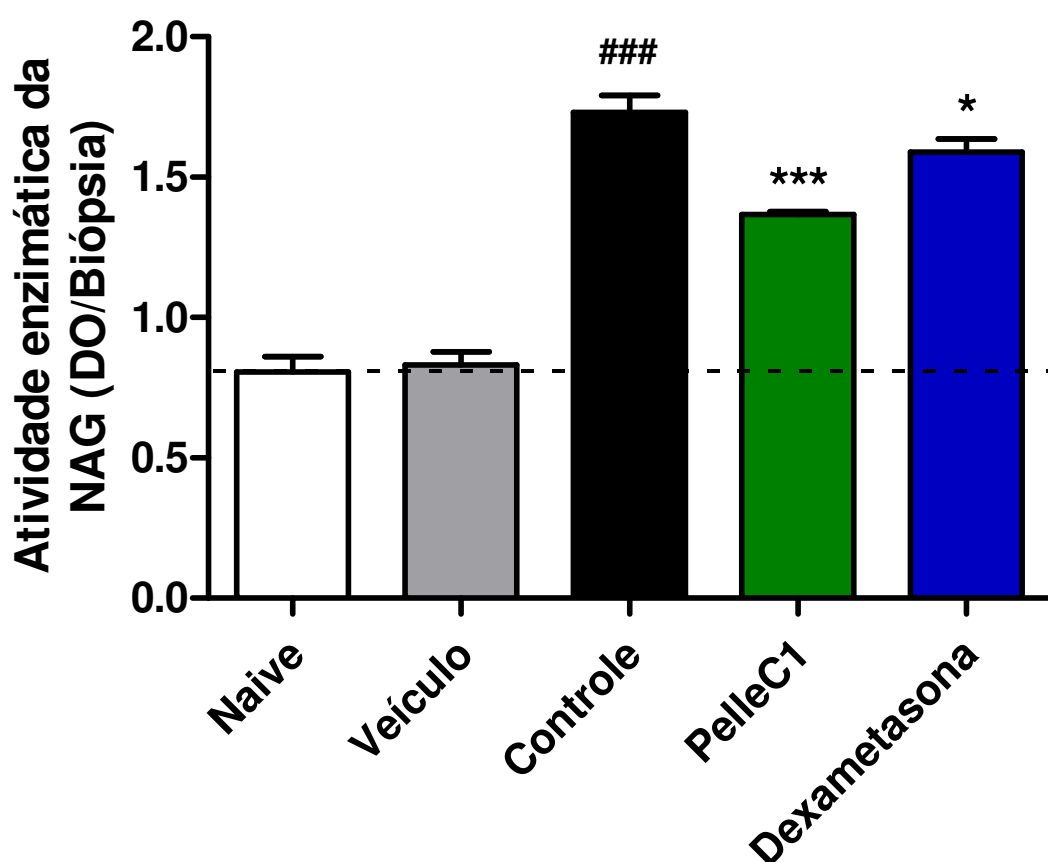


Figura 07: Efeito do PelleC1 (0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a atividade enzimática da n-acetil- β -d- glucosaminidase em sobrenadante de orelhas após múltipla aplicação de TPA. As atividades enzimáticas foram avaliadas no 9º dia após indução com múltipla aplicação de TPA. Todos os dados apresentados são média $\pm$ E.P.M. de 5 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise da variância (ANOVA), seguidas pelo teste de post-hoc de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância

quando comparados ao grupo controle. $^{***}P<0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo.

4.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA EPIDERME

As amostras das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm), submetidas à múltiplas aplicações de TPA, foram utilizadas para avaliar o processo de hiperproliferação celular na epiderme. O agente flogístico promoveu um aumento na espessura da epiderme no grupo controle ($71,13 \pm 4,21 \mu\text{m}$) quando comparado com os grupos naïve ($5,97 \pm 0,39 \mu\text{m}$) e veículo ($7,44 \pm 0,94 \mu\text{m}$). O composto PelleC1 e a dexametasona foram capazes de reduzir o aumento na espessura da epiderme em $59,85 \pm 5,05\%$ e $60,10 \pm 3,77\%$, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Figura 9). A Figura 8 apresenta fotos representativas de cortes histológicos de amostras de tecidos das orelhas dos camundongos após a múltiplas aplicações de TPA por via tópica, demonstrando que os tratamentos com PelleC1 e dexametasona causaram redução na espessura da epiderme comparando ao grupo controle.

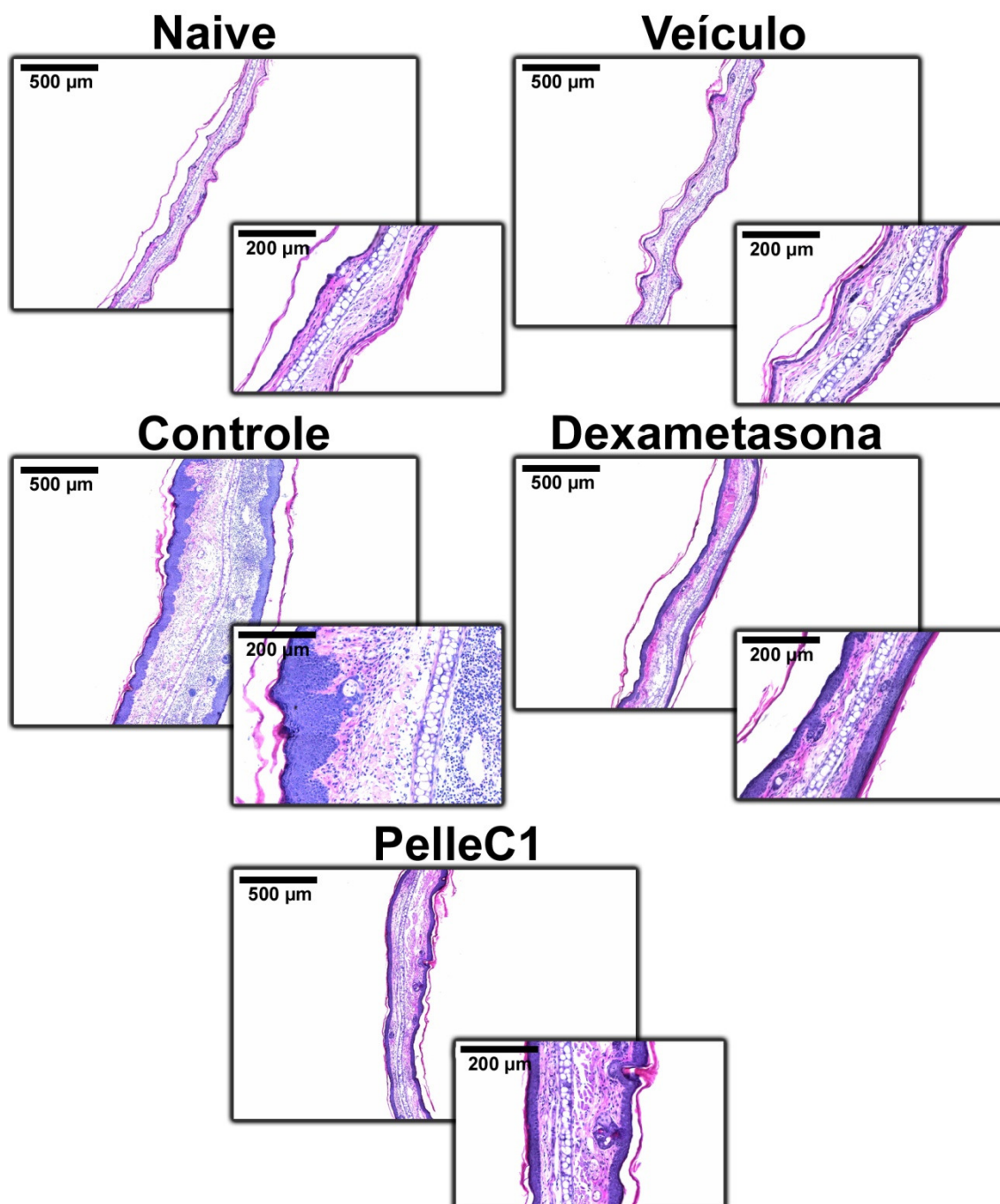


Figura 08 Imagens representativas da histologia de cortes transversais das orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 100x, escala de 500 μm e aumento de 200x, escala de 100 μm) coletadas no 9º dia após a múltipla aplicação de TPA (2,5 μg /orelha). Grupos: naive (sem tratamento), veículo (acetona), controle, PelleC1 (0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia do experimento.

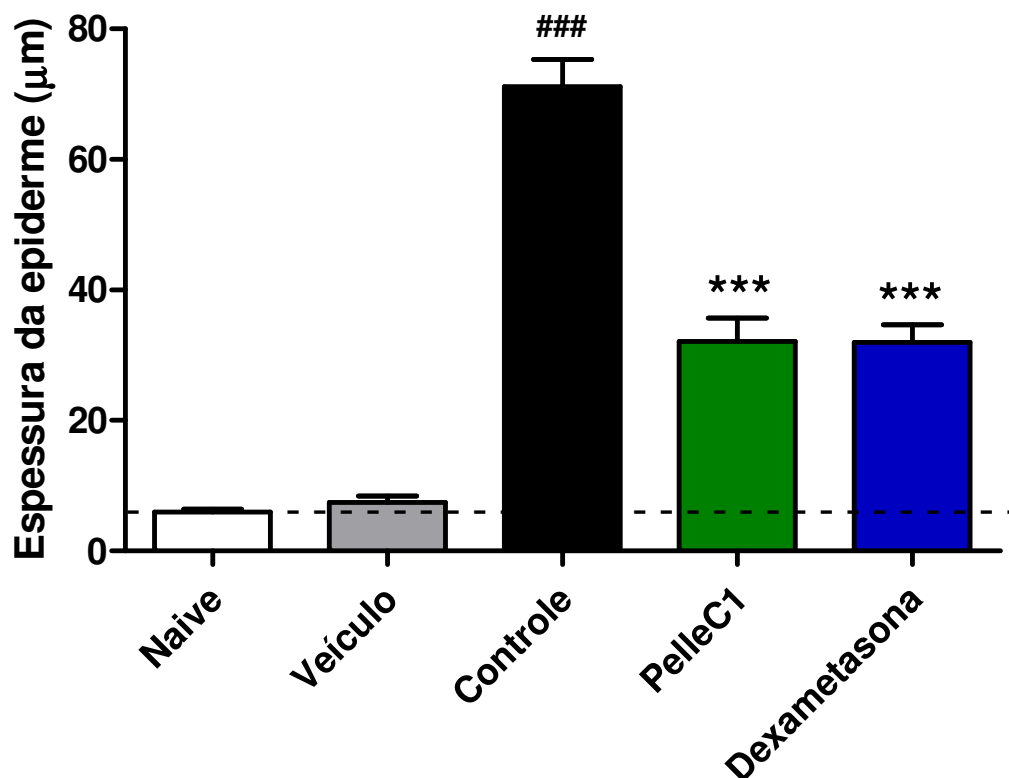


Figura 09 Efeito do PelleC1 (0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a espessura da epiderme no 9º dia após indução com múltipla aplicação de TPA. Todos os dados apresentados são média $\pm$ E.P.M. de 3 animais (3 cortes por animal, 5 campos por corte). A análise estatística 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.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PELLEC1 SOBRE A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

Foi realizada também, a contagem das células (leucócitos) localizadas na derme, após coloração dos cortes histológicos com Hematoxilina-eosina. A contagem permitiu avaliar as mudanças no padrão celular da derme da orelha direita dos camundongos após as aplicações de TPA e os respectivos tratamentos em via tópica. A indução realizada promoveu aumento significativo no número de células na derme da pele da orelha do grupo controle ($772,6 \pm 122,3$ células/campo) quando comparados aos grupos naíve ($247,4 \pm 7,7$ células/campo) e veículo ($278,0 \pm 10,5$ células/campo). Os animais tratados com dexametasona e PelleC1 apresentaram uma redução significativa de $64,75 \pm 4,7$ e $68,94 \pm 0,9\%$, respectivamente, no número de células, quando comparados com o grupo controle (Figura 10).

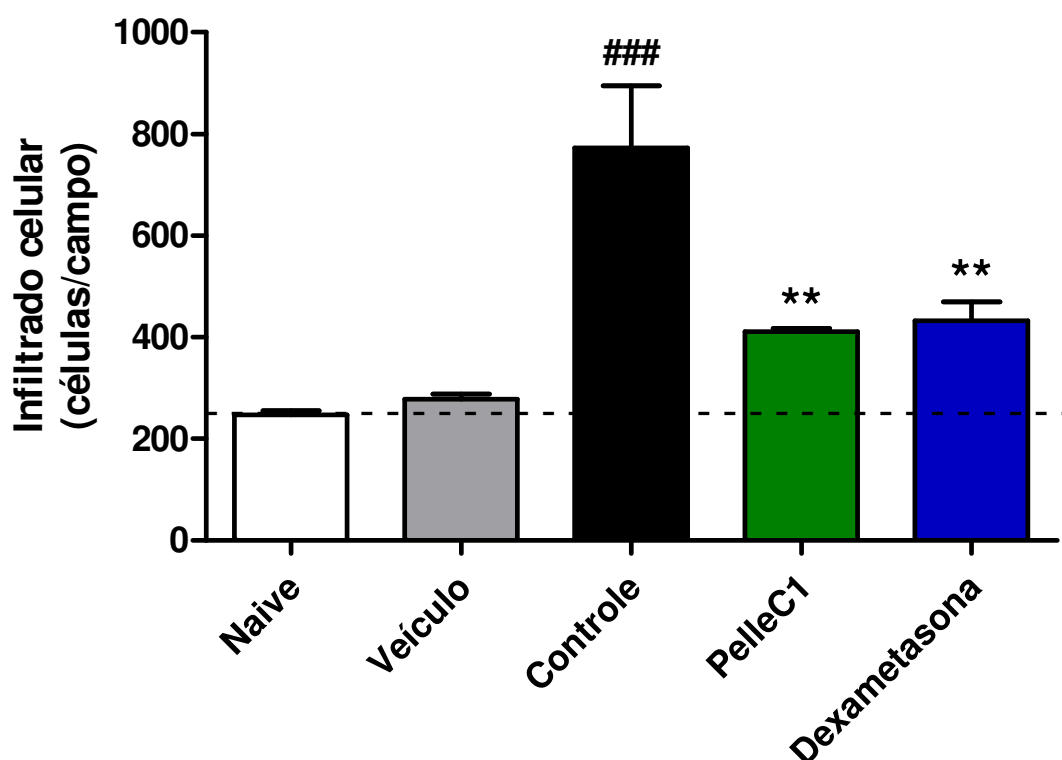


Figura 10 Efeito do PelleC1 (0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a migração leucocitária no 9º dia após indução com múltipla aplicação de TPA. Todos os dados apresentados são média $\pm$ E.P.M. de 3 animais (3 cortes por animal, 5 campos por corte) e os cortes corados 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. ** $P < 0,01$ foi indicativo de significância quando comparado com o controle.

4.7 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi avaliada pela contagem das células na pele das orelhas, pela imunomarcagem para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA). A imunohistoquímica com PCNA permitiu avaliar as mudanças no padrão de proliferação celular na pele dos camundongos após a múltipla aplicação de TPA e os respectivos tratamentos em via tópica. A múltipla aplicação de TPA promoveu aumento significativo no número de células em proliferação na pele da orelha do grupo controle ($156,4 \pm 8,5$ células/campo) quando comparados aos grupos naive ($42,2 \pm 0,9$ células/campo) e veículo ($37,5 \pm 3,6$ células/campo). Os animais tratados com dexametasona e PelleC1 apresentaram uma redução significativa de $66,3 \pm 0,5$ e $71,7 \pm 4,4\%$, respectivamente, no número de células, quando comparados com o grupo controle (Figura 12). A Figura 11 apresenta fotos representativas de cortes histológicos de amostras de tecidos das orelhas dos camundongos após a múltiplas aplicações de TPA por via tópica, demonstrando que os tratamentos com PelleC1 e dexametasona causaram redução na proliferação dos queratinócitos na camada da epiderme quando comparando ao grupo controle.

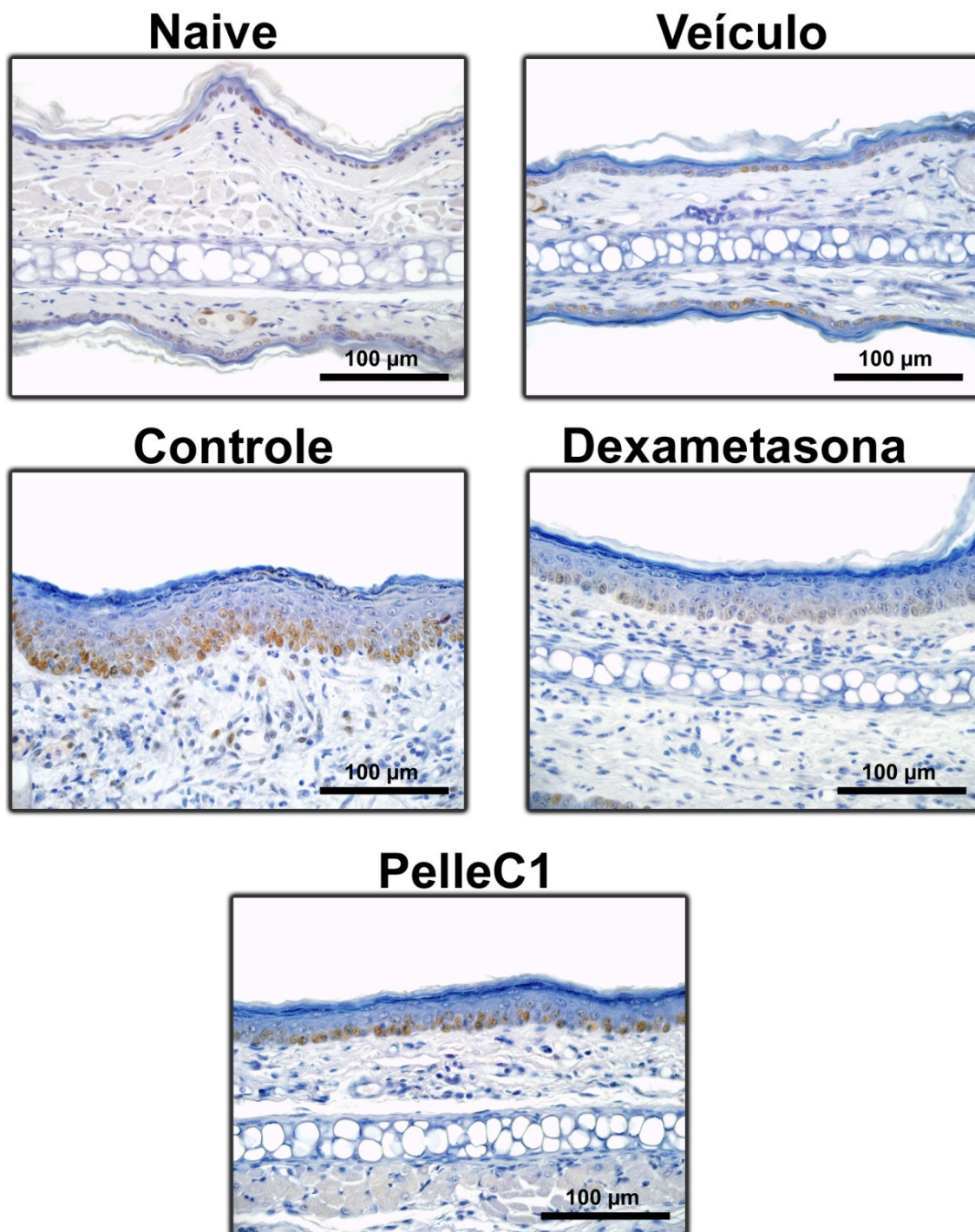


Figura 11 Imagens representativas da marcação para PCNA por imunohistoquímica em cortes transversais das orelhas de camundongos (aumento de 400x, escala de 100 µm) coletadas no 9º dia após a múltipla aplicação de TPA (2,5 µg/orelha). Grupos: naive (sem tratamento), veículo (acetona), controle, PelleC1 (0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia do experimento.

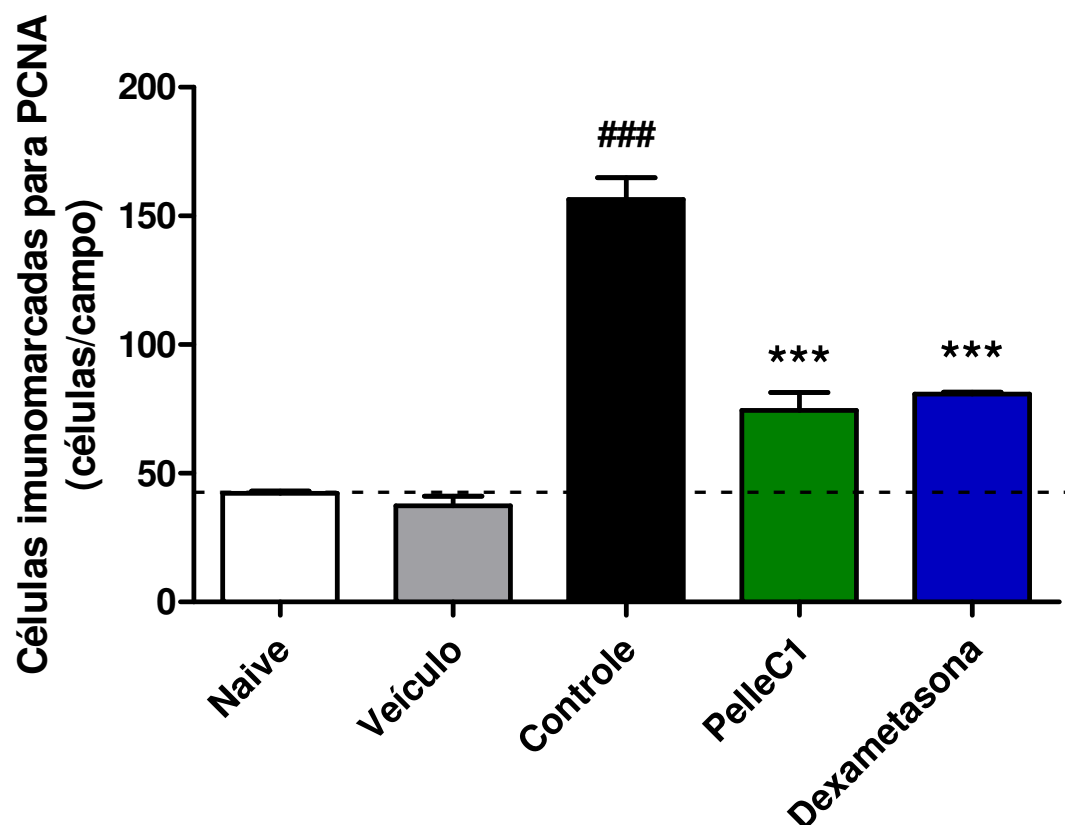


Figura 12 Avaliação imunohistoquímica do efeito do PelleC1 (0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) e veículo (acetona) sobre a proliferação celular no 9º dia após indução com múltipla aplicação de TPA. Todos os dados apresentados são média $\pm$ E.P.M. de 3 animais (3 cortes por animal, 5 campos 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 processo inflamatório é caracterizado por quatro sinais clínicos clássicos: calor, eritema, edema e dor. A utilização do edema como parâmetro de avaliação em modelos validados, permite analisar o potencial anti-inflamatório de compostos sintéticos, extrato de plantas ou compostos isolados de plantas, tanto por via tópica, quanto por via sistêmica (DE YOUNG *et al.*, 1989; GÀBOR, 2000). Assim, o edema de orelha é um modelo de inflamação cutânea, com uma metodologia simples e com obtenção rápida dos resultados. A inflamação pode ser induzida por vários agentes irritantes ou flogísticos, e entre as vantagens deste método destacam-se a necessidade de pouca quantidade de amostra e a rapidez com que são obtidos os resultados (BOUCLIER *et al.*, 1990; VANE, 2000). Quando se tem o objetivo de desenvolver medicamentos de uso tópico, esse modelo oferece ainda a vantagem de identificar compostos que apresentam uma absorção cutânea adequada de forma a atingir concentrações ideais para exercer uma atividade farmacológica (BOUCLIER *et al.*, 1990).

Entre os agentes flogísticos utilizados, temos o TPA, que é um dos principais ésteres de forbol presentes no óleo de cróton, extraído da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) (GÀBOR, 2000; GARG *et al.*, 2008). A aplicação tópica do TPA induz uma reação inflamatória cutânea que se caracteriza por vasodilatação e formação de eritema nas primeiras 2 horas, que é seguido pelo aumento da espessura da orelha em consequência do extravasamento plasmático, esse aumento da espessura atinge o pico máximo na sexta hora e tende a diminuir, atingindo os valores basais após 24 horas. A aderência dos leucócitos PMN na parede dos vasos e a degranulação dos mastócitos é verificada entre a quarta e sexta hora. Porém, a infiltração máxima de leucócitos PMN no tecido é atingida somente após 24h da aplicação tópica do TPA (YOUNG *et al.*, 1983). O modelo de inflamação de orelha induzido por éster de forbol produz edema e leva ao recrutamento de leucócitos PMN na forma aguda, e no modelo crônico, quando avaliado no sétimo dia do tratamento, predominam macrófagos e células T (STANLEY *et al.*, 1991; ALFORD *et al.*, 1992).

As características da resposta inflamatória induzida pela aplicação do TPA são justificadas pelo seu mecanismo, que consiste na ativação direta da PKC, e em sequência a ativação da via da Proteína Ativada por Mitógeno (MAP) quinase, fosfolipase A₂ (PLA₂), indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da lipoxigenase (LOX), que por sua vez ativa a síntese e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular (DE BERNARDIS *et al.*, 1994; MURAKAWA *et al.*, 2006). Alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF-κB e a AP-1, são ativados

com a ativação da via da MAP quinase pela PKC. Esses fatores de transcrição nuclear tem a função de regular a produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (SÁNCHEZ e MORENO, 1999; GLASS e OGAWA, 2006; PASCUAL e GLASS, 2006). O aumento da atividade enzimática da PLA₂ pela ativação da PKC leva ao aumento de liberação do AA dos fosfolipídios de membrana, e como consequência, leva ao aumento dos seus metabólitos como leucotrienos e prostaglandinas, via LOX e COX respectivamente (GARG *et al.*, 2008). Nos tecidos ocorre um aumento dos metabólitos do AA, o que parece ser determinante para que o processo inflamatório se inicie após a aplicação de TPA (MURAKAWA *et al.*, 2006). Os produtos do metabolismo do AA aumentam a permeabilidade vascular, resultando na formação de edema durante o processo inflamatório (GÀBOR, 2000; BRALLEY *et al.*, 2007).

Portanto, uma característica nesse modelo é uma resposta inflamatória persistente, ocasionada pela produção sequencial de mediadores inflamatórios como os eicosanóides e citocinas, sendo a PGE₂ e TNF- α os principais mediadores hematogênicos (MURAKAWA *et al.*, 2006). Logo, a atividade anti-edematogênica dos compostos ativos no modelo de orelha induzido pelo TPA ocorre pela capacidade de inibir a cascata do AA, como já foi demonstrada pelos corticóides, inibidores da PLA₂, e inibidores da COX e da LOX (GÀBOR, 2000), dentre outros que interferem de alguma maneira com a cascata após a ativação da PKC. Uma vez que o PelleC1 foi efetivo reduzindo o edema e o peso das orelhas, é possível sugerir que o composto interfere em alguma etapa na resposta inflamatória causada pelo TPA na pele, mesmo após a inflamação estar instalada. Além disso, é importante destacar que a aplicação tópica do PelleC1 foi tão eficaz quanto o corticóide dexametasona, fármaco de referência.

A aplicação tópica do TPA também resulta no aumento gradual dos níveis da enzima MPO, a avaliação da atividade desta enzima é utilizada como indicativo indireto da presença de leucócitos PMN no tecido inflamado (BRADLEY *et al.*, 1982). Esta enzima é encontrada principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, e em menor quantidade, nos lisossomos primários de monócitos. Possui característica catiônica e possui um grupamento heme. Nos neutrófilos ativados por quimiotratores, a MPO é a enzima em maior quantidade, e uma vez liberada pelos grânulos azurófilos primários, a participação desta enzima é de grande importância na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas. Esta enzima transforma o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é formado durante o metabolismo oxidativo, em ácido hipocloroso (HOCl), quando em contato com íons Cloro (Cl₂). O HOCl é um oxidante

altamente tóxico, que uma vez produzido no interior dos fagossomos, tornam-se uma potente arma contra patógenos (ARATANI *et al.*, 1999; GUILPAIN *et al.*, 2008).

A MPO também catalisa a formação de hipotiocianato, promove a oxidação de grupamentos fenol e anilina. As células endoteliais também sofrem efeito da MPO, pois se a enzima internalizar na célula, produzirá oxidantes intracelulares, podendo contribuir para o aumento do dano tecidual nos processos inflamatórios. Esses são alguns dos motivos pelos quais vem sendo associada à MPO a diversas situações patológicas, principalmente nas que existe um processo inflamatório mediado por neutrófilos (ARATANI *et al.*, 1999; GUILPAIN *et al.*, 2008).

Portanto, estudos demonstram uma forte correlação entre a atividade da MPO e o número de neutrófilos no tecido (BRADLEY *et al.*, 1982). O extrato etanólico das flores de *C. leprosum* apresentou atividade anti-edematogênica e inibição do aumento da atividade da enzima MPO no modelo de inflamação cutânea aguda induzida pela aplicação tópica de TPA (DA SILVA, 2009). Observando os resultados obtidos na avaliação do edema e da atividade enzimática da MPO após o tratamento com PelleC1 nas orelhas que sofreram aplicação múltipla de TPA, podemos sugerir que a atividade anti-inflamatória do extrato bruto da *C. leprosum* seja pelo menos em parte pela presença do composto PelleC1. O efeito do composto PelleC1 sobre a atividade da MPO sugere que este composto possui ação inibitória sobre a migração de neutrófilos quando utilizado topicamente. Assim, se a migração dos neutrófilos para a área inflamada for diminuída, os danos causados nos tecidos, por enzimas hidrolíticas e por espécies reativas, também serão diminuídos (GARRIDO *et al.*, 2004)

O processo inflamatório faz parte do processo fisiológico, pois efetua a reparação do tecido, porém, se houver um desequilíbrio neste processo, a situação pode se reverter, e no lugar de uma reparação, teremos danos (ALLER, 2006). Isso pode ser observado na atividade da MPO, é notável que o sistema formado junto com seus produtos sejam de extrema importância na proteção do organismo contra infecções, mas em situações patológicas, esse mesmo sistema que defende o organismo pode causar danos (MALLE *et al.*, 2007). Caso o organismo tenha dificuldades para erradicar o estímulo causador da reação inflamatória aguda, ou se for ativada a resposta imune adaptativa por um estímulo persistente, o processo inflamatório se agrava e evolui para uma forma crônica. A resposta do organismo a este processo se modifica, sendo que nesta situação, as células efectoras do sistema imune estão envolvidas. Os leucócitos presentes na região lesada sofrem modificações, no lugar da grande quantidade de neutrófilos no tecido inflamado, encontra-se uma mistura de componentes celulares composta por fagócitos mononucleares e células T (POBER e SESSA, 2007).

Além do acúmulo de neutrófilos, o acúmulo de leucócitos mononucleares é também uma característica comum do modelo de edema de orelha induzido por TPA, sendo ambos consequência do aumento dos níveis de eicosanóides e da expressão da COX-2 (SÁNCHEZ e MORENO, 1999; GÀBOR, 2000). A NAG é uma enzima lisossomal produzida por monócitos ativados, principalmente macrófagos. Como em um processo crônico o principal tipo celular observado são as células mononucleares (BAILEY, 1988), uma vez ativados, sofrem degranulação promovendo a liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, incluindo aminas bioativas (histamina, serotonina), citocinas, quimiocinas assim como mediadores lipídicos (LAWRENCE e GILROY, 2007). Esses mediadores promoverão o recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias, o que leva a sustentação do processo (LAWRENCE e GILROY, 2007). A medida da atividade da NAG é considerada um indicador indireto da presença de células mononucleares no foco inflamatório (BAILEY, 1988). Portanto, em um processo inflamatório crônico, a inibição da migração de células mononucleares seria interessante para contribuir para o alívio de sintomas desencadeados pelas células inflamatórias e mediadores. Uma vez que o composto PelleC1 conseguiu inibir de forma significativa a atividade da NAG, esta parece ser mais uma ação anti-inflamatória importante desse composto.

O extrato etanólico das flores de *C. leprosum*, reduziu o influxo celular para o local inflamado conforme demonstrado pela inibição do aumento da atividade da enzima MPO, no modelo de edema de orelha induzido por TPA, indicando possível influência sobre a migração celular o que foi comprovado com a análise histológica (DA SILVA, 2009). O composto PelleC1 se mostrou efetivo na redução tanto da MPO quanto da NAG, porém, estas são análises indiretas sobre a redução da migração de leucócitos. Uma melhor investigação sobre a redução da infiltração de leucócitos tornou-se necessária. Assim, através de análises de cortes histológicos das orelhas induzidas a um processo inflamatório com a aplicação múltipla de TPA, observou-se uma redução na migração leucocitária nas orelhas tratadas com o composto PelleC1. Com a contagem dos leucócitos totais localizados na derme, confirmou-se assim seu efeito sobre a redução da migração celular. Na análise histológica também foi possível observar mais uma vez a redução do edema pelo tratamento com o PelleC1 nas orelhas dos animais induzidos pela aplicação múltipla de TPA.

Portanto, tomados em conjunto, os resultados que mostram a redução do edema e da infiltração leucocitária após o tratamento realizado com o PelleC1, comprovam de forma consistente a hipótese de que este composto possui propriedades anti-inflamatórias tópicas. As informações acima relatadas são interessantes uma vez que o acúmulo de neutrófilos desempenha um papel crítico nas

doenças inflamatórias cutâneas (SCHAERLI *et al.*, 2004). Além disso, foi relatado que o acúmulo de leucócitos na pele é necessário para a progressão da reação inflamatória, bem como para superexpressão de algumas enzimas envolvidas na inflamação como COX-2 (SÁNCHEZ e MORENO, 1999).

Na psoríase ocorre um espessamento importante da epiderme, devido ao aumento da proliferação das células epidérmicas, também chamado de hiperplasia epidermal. Histologicamente, a psoríase tem aparência definida, na qual ocorre um aumento de proliferação dos queratinócitos na epiderme interfolicular com intenso espessamento da epiderme e a estrutura da epiderme torna-se muito alongada com ondulações, formando longas projeções para dentro da derme (acantose). A diferenciação dos queratinócitos na psoríase é extensivamente alterada, apresentando programação alternativa de diferenciação celular, a qual está transitoriamente expressa durante o processo de cicatrização. As placas psoriáticas apresentam escamas na superfície, que são ocasionadas pela diferenciação terminal aberrante dos queratinócitos. Além disso, ocorre uma grande infiltração de leucócitos mononucleares para a derme que podem advir da penetração do parênquima cutâneo através da transmigração de vasos ativos ou ainda os leucócitos residentes podem se expandir e criar um denso infiltrado observado em lesões psoriáticas (LOWES *et al.*, 2007).

A estrutura e a função da epiderme dependem do balanço bem controlado entre a proliferação e a diferenciação dos queratinócitos, porém, em doenças dermatológicas hiperproliferativas, como a psoríase, esse balanço é interrompido. Como resultado ocorre um crescimento epidermal semelhante ao processo regenerativo observado em processo de cicatrização. Há também uma variedade de fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e o TGF- α , que controlam o crescimento dos queratinócitos, os quais estimulam a proliferação celular basal (ALBANESI *et al.*, 2007).

Para a maioria das doenças de pele, a principal terapia é a aplicação tópica de corticóides, que tem sido a primeira escolha no tratamento de doenças de pele como eczema, dermatite atópica e seborreica (CALOU *et al.*, 2008; LAM *et al.*, 2008). Porém, as doenças inflamatórias crônicas, como a psoríase e a dermatite atópica, ainda não possuem um tratamento adequado. Isso ocorre principalmente por essas doenças apresentarem origens etiológicas complexas e também por seu processo patológico ainda não ser bem conhecido (CHI *et al.*, 2003). Apesar de diversas abordagens terem sido utilizadas e consideradas como tentativas de conter essas desordens, ainda nenhum tratamento satisfatório foi encontrado (CHI *et al.*, 2003).

A aplicação tópica do agente flogístico TPA em camundongos induz um estresse oxidativo e/ou produção de espécies reativas de oxigênio, inflamação cutânea e em seguida pode ocorrer hiperplasia epidermal (RAHMAN *et al.*, 2008). Em nosso estudo, esse agente flogístico foi utilizado em múltipla aplicação, o que induz a inflamação na pele e respostas hiperproliferativas nos animais, assemelhando-se em muitos aspectos com as doenças de pele como a psoríase (GÀBOR, 2000). O composto PelleC1 reduziu a espessura da epiderme após as aplicações de TPA, o que mostra uma provável redução na hiperproliferação dos queratinócitos, uma característica relevante, o que pode ser útil para o tratamento de doenças dermatológicas hiperproliferativas.

Para confirmar a redução na proliferação dos queratinócitos observada na análise histológica, foi realizada a análise imunohistoquímica para PCNA nos cortes transversais das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo de múltipla aplicação de TPA. O PCNA é uma proteína nuclear de 36 kDa identificada como uma proteína auxiliar da DNA polimerase- δ . A expressão de PCNA é aumentada na parte final da fase G1 e na fase S do ciclo celular. Portanto, PCNA correlaciona com o estado proliferativo da célula, a detecção do PCNA por imunohistoquímica tem permitido a avaliação da atividade proliferativa das células de uma variedade de lesões (HALL *et al.*, 1990; TAKAHASHI *et al.*, 1991). Os resultados demonstram através da análise imunohistoquímica para PCNA, que o composto PelleC1 aplicado topicamente no modelo de inflamação crônica, foi capaz de diminuir o aumento da proliferação de células na camada basal da epiderme causado pela aplicação repetida de TPA, indicando inibição do aumento da proliferação epidérmica.

Um estudo realizado por Da Silva (2009), avaliou a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das flores da *Combretum leprosum*. Nesse estudo o extrato apresentou atividade anti-edematogênica no modelo de inflamação cutânea induzida pela aplicação tópica de TPA; inibiu o aumento da atividade da enzima MPO, no modelo de edema de orelha induzido por TPA. Neste mesmo estudo, o mesmo extrato também foi capaz de inibir alguns parâmetros inflamatórios no modelo de inflamação crônica, como: migração de mononucleares, formação de edema e hiperproliferação epidérmica. O Pelle C1, que foi isolado do extrato etanólico das flores da *Combretum leprosum*, e, mostrou inibir os mesmos parâmetros inflamatórios que o extrato etanólico do trabalho de Da Silva (2009), podendo ser então, o composto PelleC1 responsável pela atividade anti-inflamatória observada.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos até o momento é possível concluir que o composto PelleC1 possui atividade anti-inflamatória quando utilizado por via tópica, uma vez que reduziu de forma significativa o edema, o peso do tecido e a migração de células inflamatórias. Compostos capazes de atuar de forma efetiva sobre estes dois eventos associados ao processo inflamatório, o edema e a infiltração de células inflamatórias, podem ser considerados um tratamento em potencial para afecções inflamatórias cutâneas. Além disso, o modelo de inflamação utilizado permitiu verificar que o composto PelleC1 também apresenta eficácia sobre a hiperplasia epidermal, efeito esse também presente em corticóides, anticitocinas e imunossuppressores, fármacos hoje utilizados no tratamento da psoríase. Estes resultados mostram a necessidade de se realizar outras análises a fim de confirmar e elucidar o mecanismo de ação do composto PelleC1.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383-395, 2007.
- ALBANESI, C.; DE PIT, O.; GIROLOMONI, G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 6, p. 581-588, 2007. ISSN 0738-081X.
- ALFORD, J. et al. Temporal infiltration of leukocyte subsets into mouse skin inflamed with phorbol ester. **Inflammation Research**, v. 37, n. 3, p. 260-267, 1992. ISSN 1023-3830.
- ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. **Sao Paulo: Hemus 341p.-illus.. ISBN 8528903095 Por Plant records. Geog**, v. 4, 1993.
- ALMEIDA, F. R. C. et al. **Estudo dos efeitos ansiolítico e relaxante muscular de Combretum leprosum MART. & EICHER.** XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 1: 191 p. 2003.
- ANGEH, J. E. et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from Combretum imberbe (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 56-60, 2007. ISSN 0378-8741.
- ARATANI, Y. et al. Severe impairment in early host defense against Candida albicans in mice deficient in myeloperoxidase. **Infection and immunity**, v. 67, n. 4, p. 1828, 1999. ISSN 0019-9567.
- ARRUDA, L.; YPIRANGA, S.; MARTINS, G. A. Tratamento sistêmico da psoríase-Parte II: imunomoduladores biológicos Systemic treatment of psoriasis-Part II: Biologic immunomodulator agents. **An Bras Dermatol**, v. 79, n. 4, p. 393-408, 2004.
- ATHAR, M. et al. 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. ISSN 0041-008X.
- BAILEY, P. J. Sponge implants as models. Methodology in immunology. v. 162, p. 327-334, 1988.
- BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v. 94, n. 6, p. 557-572, 1998. ISSN 0143-5221.
- BECKER, P. F. L. **Patologia Geral**. São Paulo: Sarvier, 1997. 248 ISBN 8573780630.

BEDI, M.; SHENEFELT, P. Herbal therapy in dermatology. **Archives of dermatology**, v. 138, n. 2, p. 232, 2002.

BOUCLIER, M. et al. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 42, n. 2, p. 127, 1990. ISSN 0031-6997.

BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 9, p. 699, 2005. ISSN 1474-1733.

BRADLEY, P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRALLEY, E. E. et al. Topical anti-inflammatory activities of Vitis rotundifolia (Muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **Journal of medicinal food**, v. 10, n. 4, p. 636-642, 2007. ISSN 1096-620X.

BRIGATI, C. et al. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 19, n. 3, p. 247-258, 2002. ISSN 0262-0898.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants**. Paris: Lavosier, 1993.

BURBACH, G. J.; ANSEL, J. C.; ARMSTRONG, C. A. Cytokines in the skin. In: the Biology of the Skin. **The New York:Parthenon Publishing Group**, n. 1, p. 299-3319, 2000.

CALIXTO, J. et al. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **emd**, v. 6, n. 2, p. 261-279, 2001.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica**, v. 69, n. 11, p. 973-983, 2003. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0346059349&partnerID=40&md5=32bed488c92d34a82280d73e48344913>>.

CALOU, I. B. F. et al. 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, n. 8, p. 1511-1516, 2008. ISSN 0918-6158.

CALS-GRIERSON, M. M.; ORMEROD, A. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide**, v. 10, n. 4, p. 179-193, 2004. ISSN 1089-8603.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 4, p. 328-340, 2005.

CHAVES, E. M. F.; BARROS, R. F. M.; ARAUJO, F. S. Flora apícola do Carrasco no município de Cocal, Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. pg. 555-557, 2007. ISSN 1980-4849.

CHI, Y. S. et al. Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. **Biochemical pharmacology**, v. 66, n. 7, p. 1271-1278, 2003. ISSN 0006-2952.

CHUONG, C. M. et al. What is the 'true' function of skin? **Exp Dermatol**, v. 11, n. 2, p. 159-87, Apr 2002. ISSN 0906-6705 (Print)

CLARK, A. Natural Products. In: WILLIAMS, D. e LEMKE, T. L. (Ed.). **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

CNIP/APNE. Mofumbo. 2011. Disponível em: <
http://www.cnip.org.br/banco_img/Mofumbo/index.htm >. Acesso em: 25 abril, 2011.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002. ISSN 0028-0836.

DA SILVA, C. D. ***Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae) – Avaliação da Atividade Antiinflamatória tópica em modelos de Inflamação de pele agudo e crônico em Camundongos**. 2009. 82 Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DANTAS, D. et al. Estudo fitoquímico dos frutos de *Melia azedarach* L.(Cinamomo, Meliaceae). **Encontro de Pesquisa e iniciação científica da UNIDERP**, v. 2, p. 119-120, 2000.

DATTNER, A. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. **Dermatologic Therapy**, v. 16, n. 2, p. 106-113, 2003.

DAVIDOVICI, B. B. et al. Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions. **Journal of Investigative Dermatology**, 2010. ISSN 0022-202X.

DE BERNARDIS, E. et al. Protective effects of papaverine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Inflammation Research**, v. 42, n. 1, p. 29-33, 1994. ISSN 1023-3830.

DE YOUNG, L. et al. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Inflammation Research**, v. 26, n. 3, p. 335-341, 1989.

DIPIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock**, v. 4, n. 4, p. 233-240, 1995.

FACUNDO, V. A. et al. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 411-415, 1993. ISSN 0031-9422.

FACUNDO, V. A. et al. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: antiinflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1309-1312, 2005.

FIRESTEIN, G. S. Mechanisms of inflammation and tissue repair . GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. . In: (Ed.). **Textbook of Medicine**. 22, 2004. p.227.

FITZPATRICK, T. et al. Biology of the melanin pigmentary system. **Dermatology in general medicine**, p. 131–163, 1979.

FOX, L. P. As bases farmacológicas da terapêutica. In: BRUNTON, L. L. L., J.S.; PARKER, K.L.GOODMAN & GILMAN (Ed.). **Farmacologia dermatológica**. 11. Rio de Janeiro:McGrawHill, 2006. p.1534-1537.

FREINKEL, R.; WOODLEY, D. **The biology of the skin**. Taylor & Francis, 2001.

FRY, L.; BAKER, B. S.; POWLES, A. V. Psoriasis--A possible candidate for vaccination. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 5, p. 286-289, 2007. ISSN 1568-9972.

FYHRQUIST, P. Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African *Combretum* Loebl., *Terminalia* L. and *Pteleopsis* Engl. Species (Combretaceae). **Dissertação Acadêmica. Universidade de Helsinki, Helsinki**, 2007.

GÀBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 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, 2008. ISSN 0143-3334.

GARRIDO, G. et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). **Pharmacological Research**, v. 50, p. 143-149, 2004.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 1, p. 44-55, 2006. ISSN 1474-1733.

GNIADOCKI, R. Regulation of keratinocyte proliferation. **General pharmacology**, v. 30, n. 5, p. 619-622, 1998. ISSN 0306-3623.

GORDON, K. B.; MCCORMICK, T. S. Evolution of biologic therapies for the treatment of psoriasis. **SKINmed**, v. 2, n. 5, p. 286-294, 2003.

GOTTLIEB, A. et al. Expression of HLA-DR molecules by keratinocytes, and presence of Langerhans cells in the dermal infiltrate of active psoriatic plaques. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 164, n. 4, p. 1013, 1986. ISSN 0022-1007.

GOTTLIEB, A. B. Psoriasis: emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 1, p. 19-34, 2005. ISSN 1474-1776.

GRÜTZKAU, A. et al. Synthesis, Storage, and Release of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) by Human Mast Cells: Implications for the Biological Significance of VEGF206. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, n. 4, p. 875-884, 1998. ISSN 1059-1524.

GUDJONSSON, J. E.; ELDER, J. T. Psoriasis: epidemiology. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 6, p. 535-546, 2007. ISSN 0738-081X.

GUILPAIN, P. et al. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 6, p. 421-425, 2008. ISSN 1568-9972.

GUTTMAN YASSKY, E.; KRUEGER, J. Psoriasis: evolution of pathogenic concepts and new therapies through phases of translational research. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 6, p. 1103-1115, 2007. ISSN 1365-2133.

HAAKE, A.; SCOTT, G.; HOLBROOK, K. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. **The Biology of the Skin**, v. 2001, p. 19-45, 2001.

HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v. 10, n. 2, p. 153-63, Nov 2005. ISSN 1087-0024 (Print)1087-0024 (Linking).

HALL, P. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some, neoplasms. **The Journal of pathology**, v. 162, n. 4, p. 285-294, 1990. ISSN 1096-9896.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10^a. **Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan**, 2004.

KUSHNER, I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 9, n. 3-4, p. 191-196, 1998.

LAM, J.; POLIFKA, J. E.; DOHIL, M. A. Safety of dermatologic drugs used in pregnant patients with psoriasis and other inflammatory skin diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 2, p. 295-315, 2008. ISSN 0190-9622.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., *et al* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. Florianópolis: UFSC, 2000. p.181-196.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007. ISSN 1365-2613.

LEE, D. Y. et al. Anti-inflammatory activity of Chrysanthemum indicum extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 1, p. 149-154, 2009. ISSN 0378-8741.

LIU, Y.; KRUEGER, J. G.; BOWCOCK, A. M. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. **Genes and immunity**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007. ISSN 1466-4879.

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

MAN, M. Q. et al. 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. ISSN 1600-0625.

MARINHO, I. V. et al. **Espécies vegetais da caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem ferrão como fonte de recursos e local de nidificação.** I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária. João Pessoa 2002.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997. ISSN 0036-8075.

MARTINS, E. et al. **Plantas medicinais**. Universidade Federal de Vicosa Imprensa Universitaria, 2000. ISBN 8572690115.

MCGAW, L. et al. An investigation on the biological activity of Combretum species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 1, p. 45-50, 2001. ISSN 0378-8741.

MEDEIROS, C. M. et al. **Atividade analgésica e antiinflamatória do extrato etanólico da raiz de Combretum leprosum Mart. (Combretaceae) (06.032).** XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 1: 134 p. 2003.

MENESES, A. D. et al. **Atividade antiulcerogênica de Combretum leprosum MART & EICHE.** XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 1: 193 p. 2003.

MEYER, S. et al. Use of phytopharmaceutical agents in dermatology. Indications, therapeutic approaches and side effects. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, v. 56, n. 5, p. 483, 2005.

MONTAGNA, W.; PARAKKAL, P. F. The pilary apparatus. In The Structure and Formation of Skin. **New York: Academic Press**, p. 172 - 258, 1974.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 735-744, 2006. ISSN 0959-8049.

MURAKAWA, M. et al. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-[alpha] in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1331-1336, 2006. ISSN 0006-2952.

NESTLE, F.; TURKA, L.; NICKOLOFF, B. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 1, p. 202, 1994.

NICKOLOFF, B.; NESTLE, F. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 12, p. 1664-1675, 2004.

NOGRALES, K. et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. **The British journal of dermatology**, v. 159, n. 5, p. 1092, 2008.

NORRIS, D. A. Structure and function of the skin. In: (Ed.). **GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D.**

Textbook of Medicine. 22, 2004. p.2444-2446.

OJEWOLE, J. A. Cardiovascular effects of mollic acid glucoside, a 1alphahydroxycycloartenoid saponin extractive from Combretum molle R Br ex G Don (Combretaceae) leaf. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 19, p. 128-134, 2008a.

OJEWOLE, J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of mollic acid glucoside, a 1 alpha-hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R. Br. ex G. Don (Combretaceae) leaf. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 30-35, 2008b.

PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 8, p. 321-327, 2006. ISSN 1043-2760.

PIETROVSKI, E. F. et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihidroxiup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 90-99, 2006.

RAHMAN, S. et al. Topically applied vitamin E prevents massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chemico-biological interactions**, v. 172, n. 3, p. 195-205, 2008. ISSN 0009-2797.

RANG, H. et al. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2007.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia: Texto e Atlas**. 2. Rio de Janeiro: Médica Panamericana, 1993. 347

SAMPAIO, S. A. P.; CASTRO, R. M.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia Básica**. 2. São Paulo: Artes médicas, 2000.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2. São Paulo: Arte Médica, 2000.

SÁNCHEZ, T.; MORENO, 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.

SARTI, S. J.; CARVALHO, J. C. Fitoterapia e fitoterápicos. In: CARVALHO, J. C. T. (Ed.). **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004. p.13-38.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002. ISSN 0163-7258.

SCHAEFER, H.; REDELMEIER, T. **Skin barrier: principles of percutaneous absorption**. S Karger Pub, 1996.

SCHAERLI, P. et al. Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 3, p. 2151, 2004. ISSN 0022-1767.

SCHOEPE, S. et al. Glucocorticoid therapy induced skin atrophy. **Experimental dermatology**, v. 15, n. 6, p. 406-420, 2006. ISSN 1600-0625.

SCHÖN, M. P.; BOEHNCKE, W. H. Psoriasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1899-1912, 2005.

SEELIGER, S. et al. 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, 2003. ISSN 0892-6638.

SIMMONS, D. L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug discovery today**, v. 11, p. 210-219, 2006.

SKINNER, R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 8, p. 22-31, 2005.

STANLEY, P. L. et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology**, v. 4, p. 262-271, 1991.

TAKAHASHI, H.; STRUTTON, G.; PARSONS, P. Determination of proliferating fractions in malignant melanomas by anti PCNA/cyclin monoclonal antibody. **Histopathology**, v. 18, n. 3, p. 221-227, 1991. ISSN 1365-2559.

TAN, J. K. et al. Mechanisms of action of etanercept in psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 12, p. 38-45, 2007.

VALDIMARSSON, H. et al. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? 1. **Immunology today**, v. 16, n. 3, p. 145-149, 1995. ISSN 0167-5699.

VAN DE KERKHOF, P. et al. Once weekly administration of etanercept 50 mg is efficacious and well tolerated in patients with moderate to severe plaque psoriasis: a randomized controlled trial with open label extension. **British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 5, p. 1177-1185, 2008. ISSN 1365-2133.

VANE, J. I. G. M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. **Budapest: Akadémiai Kiadó**, v. 11, 2000.

WEISENSEEL, P. et al. Streptococcal infection distinguishes different types of psoriasis. **Journal of medical genetics**, v. 39, n. 10, p. 767, 2002. ISSN 1468-6244.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003. ISSN 0031-9333.

WERTH, V. P. Principles of therapy. In: GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. . In: (Ed.). **Textbook of Medicine**: 22, 2006. p.2462.

WILLIAMS, I.; KUPPER, T. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sciences**, v. 58, n. 18, p. 1485-1507, 1996.

WOLLENBERG, A. et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 5, p. 1096-1102, 2002. ISSN 0022-202X.

YOUNG, J. M.; WAGNER, B. M.; SPIRES, D. A. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate-and arachidonic acid-induced ear edema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 48-52, 1983. ISSN 0022-202X.

ZABA, L. C. et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 3183–3194, 2007.