



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

NATÁLIA BITU PINTO

**EFEITO DA FISALINA E, ISOLADA DA *PHYSALIS ANGULATA*, EM MODELOS
DE DERMATITE DE CONTATO INDUZIDA POR TPA E OXAZOLONA EM
CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

NATÁLIA BITU PINTO

**EFEITO DA FISALINA E, ISOLADA DA *PHYSALIS ANGULATA*, EM MODELOS
DE DERMATITE DE CONTATO INDUZIDA POR TPA E OXAZOLONA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador (a): Prof^a. Dra. Flávia Almeida Santos

FORTALEZA

2009

P729e Pinto, Natália Bitú

Efeito da fisalina E, isolada da *Physalis angulata*, em modelos de dermatite de contato induzida por TPA e oxazolona em camundongos/ Natália Bitu Pinto. – Fortaleza, 2009.

139 f. : il.

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Flávia Almeida Santos
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, CE.

1. Solanaceae 2. Dermatite 3. Antiinflamatórios 4. Acetato de Tetradecanoilforbol 5. Oxazolona I. Santos, Flávia Almeida (orient.) II. Título.

CDD: 583.952

NATÁLIA BITU PINTO

EFEITO DA FISALINA E, ISOLADA DA *PHYSALIS ANGULATA*, EM MODELOS DE DERMATITE DE CONTATO INDUZIDA POR TPA E OXAZOLONA EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Aprovada em 01/12/2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Mariana Lima Vale

Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

Universidade Federal do Ceará

*Á Deus por permitir a realização deste trabalho e por ter me dado
forças nos momentos que mais precisei.*

*Aos meus pais, **Francisco Leandro Pinto e Laura Maria G. Bitu Pinto**, pela dedicação
incondicional e incentivo aos meus estudos.*

*Aos meus irmãos, **Leandro Filho, Eduardo e Eli**, por estarem presentes nos momentos
mais importantes da minha vida.*

*Ao meu querido **Diego**, pelos infinitos momentos de felicidades compartilhados e por
estar sempre ao meu lado me apoiando e me ajudando.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Flávia Almeida Santos, pela constante presença como professora, pela orientação neste trabalho e acima de tudo pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao pela colaboração fundamental neste trabalho e pela co-orientação.

À Profa. Otília Deusdênia L. Pessoa e a doutoranda Maria Leopoldina Veras pelo fornecimento da Fisalina E, a base da realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade pela orientação e ajuda nos experimentos.

As Profa. Kalyne Leal e Mariana Vale por terem aceitado participarem da banca e por contribuírem de forma relevante para a melhoria deste trabalho

A mestranda Talita Cavalcante Moraes, pela amizade e companheirismo, e por diretamente ter contribuído para o êxito deste trabalho.

As mestrandas do LPN, Karine Carvalho e Julyanne Frota, pela amizade e ajuda nos experimentos.

Aos amigos e colegas de mestrado, Nayrton Flávio, Emiliano Rios, Edith Teles e Helvira Félix pelos infinitos momentos de descontração e pela amizade inestimável.

Aos doutorandos do LPN, Silvéria Regina, Cinthya Iamile, Marjorie Moreira, Alana, Ana Carla, Célio Lima e Caroline Mourão pelas longas horas de contribuição nos meus experimentos e pelo inestimável companheirismo.

À Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito pela ajuda no estudo histopatológico e pela presteza com que sempre me atendeu.

Aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e me deram a força necessária para enfrentar e vencer todos os obstáculos

Aos bolsistas de iniciação científica do LPN, Cecília, Juliana Catarina, Paloma, Tiago, Patrícia, Karla, Iago, Natércia e João Carlos.

As técnicas do Laboratório de Produtos Naturais, Dona Marta e Anyssa, pela manutenção na organização do LPN e pela contribuição nos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Aura Rhanes, Márcia, Chiquinho, Íris, Alana, Fernando, Sr. Carlos e Joana.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

*“Recebei a instrução e não o dinheiro
Preferi a ciência ao fino ouro, pois
a Sabedoria vale mais que as pérolas
e jóia alguma pode igualar”*

(Provérbios 8,10-11)

RESUMO

A Fisalina E (FIS E), isolada das partes aéreas da *Physalis angulata* (Solanaceae), foi avaliada em modelos de dermatite de contato induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e por oxazolona (OXA) em camundongos. A dermatite de contato irritativa aguda foi induzida pela administração tópica de TPA (2,5µg/orelha) e avaliada após 4h. A FIS E(0,125;0,25 e 0,5 mg/orelha,por via tópica) reduziu de forma significativa o edema de orelha induzido por TPA em 33,1; 38,7; 39%, respectivamente, e dexametasona(0,05 mg/orelha,por via tópica) reduziu em 95,2%. Nas mesmas doses, a FIS E assim como a Dexa, reduziram em 45,7; 52,5; 67,6 e 83,4 %, respectivamente, a atividade da mieloperoxidase (MPO) tecidual. FIS E (3, 10 e 30 mg/kg,por via oral) e Dexa (1mg/kg,por via oral) reduziram o edema de orelha em 34,8; 40,7, 47,3 e 46,6% respectivamente. Nas mesmas doses, a FIS E assim como a Dexa, reduziram em 39,3; 46,7 e 54,3 e 81,7 %, respectivamente, a atividade da mieloperoxidase (MPO) tecidual. A FIS E (0.5 mg/orelha) foi capaz de reduzir os níveis teciduais de TNF- α de $8,71\pm 1.18$ pg/ml (veículo) para $2,95\pm 0.81$ pg/ml e a dexametasona (0,05 mg/orelha) para $2,35\pm 0.94$ pg/ml, representando uma redução de 66,2 e de 73 %, respectivamente. A administração de Mifepristone (25 mg/kg,s.c), antagonista esteroidal, reverteu os efeitos da FIS E e da Dexa, por via oral e tópica, sobre a redução do edema, atividade da mieloperoxidase e níveis de TNF- α . Na marcação imunohistoquímica para TNF- α e NF- κ B, a FIS E (0,5 mg/orelha) e a dexametasona (0,05 mg/orelha) reduziram a intensidade de marcação do TNF- α e NF- κ B, e o Mifepristone, reverteu esse efeito. A ação antiinflamatória da FIS E no modelo da dermatite aguda induzida por TPA foi confirmada pelos achados histopatológicos, com a redução do edema, infiltrado inflamatório de mono e polimorfonucleares. Na dermatite crônica foi induzida pela aplicação tópica de 20 µl de uma solução de TPA (2,5µg/orelha) em dias alternados durante 10 dias, a FIS E, por via tópica, nas doses 0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha, reduziu, de forma significativa, o edema de orelha, em 19, 23 e 30,3%, respectivamente, enquanto a Dexa (0,05mg/orelha) reduziu em 32,6 %. FIS E (0,125;0,25 e 0,5 mg/orelha,por via tópica) e a Dexa(0,05mg/orelha) reduziram a atividade tecidual da MPO em 30; 38,8; 50,8 e 56,6%, respectivamente. A administração oral da FIS E (3, 10 e 30 mg/kg), reduziu, de forma significativa, o edema de orelha crônico, em 8; 14,8; 17 %, respectivamente, e a Dexa (1 mg/kg) reduziu em 20,7 %. Nas mesmas doses, a FIS E e a Dexa reduziram a atividade da MPO em 43,1; 54,5 ;59,3 e 65 %,respectivamente. O modelo de dermatite de contato induzida por oxazolona (OXA, 1%/orelha), provocou uma hiperplasia epidérmica onde o INF- γ teve papel crucial. A FIS E, por via oral e tópica, reduziu de forma significativa, a hiperplasia epidérmica do 7° ao 19° dia de observação. A FIS E (0.5 mg/orelha, por via tópica) diminuiu os níveis de IFN- γ em 43,5% e a Dexa (0.05 mg/orelha, via tópica) em 37,5%. Os resultados encontrados, comprovados pelo estudo histológico, demonstram o efeito antiinflamatório da Fisalina no modelo de dermatite de contato alérgica crônica. Concluímos que a Fisalina E demonstrou atividade antiinflamatória, por via tópica e oral, nos modelos de dermatite de contato induzida por TPA e oxazolona em camundongos, possivelmente através da interação com receptores de glicocorticóides.

Palavras-chave: *Physalis angulata*. Fisalina E. Dermatite. Atividade Antiinflamatória. TPA. Oxazolona.

ABSTRACT

The physalin E (PHY E), isolated from the aerial parts of *Physalis angulata* (Solanaceae), was assessed in models of contact dermatitis induced by 13-acetate-12-o-tetradecanoyl-phorbol (TPA) and oxazolone (OXA) in mice. The irritant contact dermatitis was induced by acute topical administration of TPA (2,5 mg/ear) and evaluated after 4h. The PHY E topically applied to ear at 0,125;0,25 and 0,5 mg/ear and dexamethasone (Dexa), topically, a dose of 0,05 mg/ear, reduced significantly the edema ear induced by TPA in 33,1; 38,7; 39 and 95,2%, respectively. In the same doses, PHY E as well as Dexa, reduced by 45,7; 52,5; 67,6 and 83,4%, respectively, the activity of myeloperoxidase (MPO) in tissue. Oral administration of PHY E (3,10 and 30 mg/kg) and DEXA (1 mg/kg) decreased the ear edema by 34,8; 40,7;47,3 and 46,6% respectively. The same doses, PHY E as well as Dexa, reduced by 39,3; 46,7;54,3% and 81,7%, respectively, the activity of myeloperoxidase (MPO) tissue. The PHY E (0,5 mg/ear) was able to reduce the tissue levels of TNF- α of $8,71\pm 1.18$ pg/ml (vehicle) to $2,95\pm 0.81$ pg/ml and dexamethasone (0,05 mg/ear) to $2,35\pm 0.94$ pg/ml, showing a reduction of 66.2 and 73%, respectively. The administration of mifepristone (25 mg/kg,sc), a steroid antagonist, reversed the effects of PHY E and Dexa, orally and topically, on reducing the edema, myeloperoxidase activity and levels of TNF- α . In the immunohistochemical analysis for TNF- α and NF- κ B, PHY E (0,5 mg/ear) and dexamethasone (0,05 mg/ear) reduced the intensity of marking the TNF- α and NF- κ B, and mifepristone reversed this effect. The anti-inflammatory action of the PHY E in the model of the dermatitis TPA-induced were confirmed by histopathological findings, with the reduction of edema and inflammatory infiltration of mono and polymorphonuclear. The chronic dermatitis was induced by application of 20 μ l solution of TPA (2,5 mg/ear) was applied topically every other day for 10 days, PHY E topically applied (0,125, 0,25 and 0,5 mg/ear) reduced significantly the edema of the ear, 19; 23; 30,3%, and Dexa (0,05 mg/ear) decreased by 32,6%. In the same doses, PHY E and Dexa reduced tissue activity of MPO in 30; 38,8;50,8 and 56,6%, respectively. Oral administration. PHY E (3, 10 and 30 mg/kg) reduced significantly the ear edema chronic in 8, 14,8 and 17%, respectively, and Dexa (1 mg/kg) reduced in 20.7%. In the same doses, PHY E and Dexa reduced activity of MPO in 43.1, 54.5, 59.3 and 65% respectively. The model of contact dermatitis induced by oxazolone (OXA, 1%/ear) caused an epidermal hyperplasia where the INF- γ played crucial role. PHY E oral and topical, has significantly reduced the epidermal hyperplasia of 7 th to 19 th day of observation Physalin E (0,5 mg/ear topically) decreased levels of IFN- γ in 43,5% and Dexa (0,05 mg/ear topically) to 37,5% when compared to vehicle. Our results, as evidenced by histological study, demonstrate the anti-inflammatory effect of physalin in the model of contact dermatitis allergic. In conclusion, the results obtained showed that PHY E presented anti-inflammatory activity either when was used by oral and topical route in the models of contact dermatitis TPA and Oxazolone-induced in mice, possible trough the interaction with glucocorticoids receptors.

Keywords: *Physalis angulata*. Physalin E. Dermatitis. Anti-Inflammatory Activity. TPA. Oxazolone.

LISTA DE FIGURAS

1	Distribuição Geográfica no Brasil de <i>P.agulata</i> Lin	23
2	<i>Physalis angulata</i> Lin	24
3	Estrutura básica das fisalinas	27
4	Estrutura Química de algumas fisalinas	29
5	Esquema simplificado de uma seção transversal de pele demonstrando as três camadas da pele e os tipos celulares presentes	30
6	Esquema simplificado de uma seção transversal da epiderme	31
7	Mecanismo Fisiopatológico da dermatite de contato alérgica	41
8	Estrutura Química da Fisalina E	55
9	Método de obtenção da Fisalina E	56
10	Efeito da Fisalina E administrada por via tópica no edema de orelha agudo induzido por TPA em camundongos	63
11	Efeito da Fisalina E administrada por via oral no edema de orelha induzido por TPA em camundongos	64
12	Participação dos receptores esteróides no mecanismo de ação antiedematogênico tópico da Fisalina E	66
13	Participação dos receptores esteróides no mecanismo de ação antiedematogênico oral da Fisalina E	67
14	Efeito da Fisalina E administrada por via tópica na atividade da Mieloperoxidase induzida por TPA na dermatite de contato aguda em camundongos	69
15	Participação dos receptores esteroidais no mecanismo de ação tópico da Fisalina E sobre a atividade da Mieloperoxidase na dermatite de contato aguda induzida por TPA	70
16	Efeito da Fisalina E, administrada por via oral, na atividade de Mieloperoxidase na dermatite aguda induzida por TPA em camundongos	71
17	Participação dos receptores esteróides no mecanismo de ação oral da Fisalina E sobre a atividade de Mieloperoxidase na dermatite de contato aguda induzida por TPA	72
18	Efeito da Fisalina E, administrada topicamente, nos níveis de TNF- α na dermatite de contato aguda induzida por TPA	74
19	Efeito da Fisalina E, administrada oralmente, nos níveis de TNF- α na dermatite de contato aguda induzida por TPA	75
20	Análise histológica de orelhas de camundongos tratados topicamente com Fisalina E e Dexametasona na dermatite de contato aguda induzida por TPA: Papel dos receptores esteroidais	77
21	Análise histológica de orelhas de camundongos tratados oralmente com Fisalina E e Dexametasona na dermatite de contato aguda induzida por TPA: Papel dos receptores esteroidais	78
22	Efeito da Fisalina E, administrada por via tópica, no edema de orelha induzida por TPA na dermatite de contato crônica em camundongos	80
23	Efeito da Fisalina E, administrada por via oral, no edema de orelha induzida por TPA na dermatite de contato crônica em camundongos	81
24	Efeito da Fisalina E, administrada por via tópica, na atividade da mieloperoxidase na dermatite crônica induzida por TPA em camundongos	83

25	Efeito da Fisalina E administrada por via oral na atividade da Mieloperoxidase na dermatite de crônica induzida por TPA em camundongos	84
26	Fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF- α da orelha de camundongos tratados com Fisalina E, por via tópica, na dermatite de contato irritativa aguda por TPA: Participação dos receptores esteroidais	86
27	Fotomicrografias de imunohistoquímica para NF- κ B da orelha de camundongos tratados com Fisalina E, por via tópica, na dermatite de contato irritativa aguda por TPA: Participação dos receptores esteroidais	88
28	Efeito da Fisalina E administrada por via tópica sobre a hiperplasia epidérmica induzida por oxazolona em camundongos	90
29	Efeito da Fisalina E administrada por via oral sobre a hiperplasia epidérmica induzida por oxazolona em camundongos	91
30	Efeito da Fisalina E administrada por via tópica nos níveis teciduais de IFN- γ induzidos por oxazolona em camundongos	93
31	Análise histológica de orelhas de camundongos submetidos a indução da dermatite de contato alérgica induzida por oxazolona	95

LISTA DE QUADROS

1	Etnofarmacologia do gênero <i>Physalis</i>	21
2	Principais constituintes químicos encontrados na família Solanaceae.....	26

LISTA DE SIGLAS

±	Mais ou menos
%	Porcentagem
®	Marca registrada
α	Alfa
γ	Gama
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrometro
ANOVA	Análise de Variância
cm	Centímetro
COX-2	Ciclooxigenase 2
DEXA	Dexametasona
EEPA	Extrato Bruto Etanólico da <i>Physalis angulata</i>
EHPA	Extrato Bruto hidroalcoólico da <i>Physalis angulata</i>
et al.	e colaboradores
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
ex	Exemplo
Fis E	Fisalina E
g	Gramma
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
IL	Interleucina
INF	Interferon
IP-10	Proteína Induzível
Kg	Kilograma
mg	Miligrama
min.	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimol
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
nm	Nanômetro
oC	Grau centígrado
OXA	Oxazolona
p	Nível de significância
P.A.	Para análise
PDE-4	Fosfodiesterase tipo 4
pH	Potencial de hidrogênio
PKC	Proteína quinase C
s.c	Via subcutânea
TGF	Fator de Transformação do Crescimento
TPA	13-acetato de 12-o-tetradecanoil-forbol
TNF	Fator de Necrose Tumoral
v.o	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Generalidades	17
1.2 Gênero <i>Physalis</i>	19
1.2.1 <i>Physalis angulata</i> Lin.....	22
1.2.2 Descrição botânica de <i>Physalis angulata</i> Lin.	24
1.2.3 Constituintes químicos isolados do gênero <i>Physalis</i>	25
1.2.4 As fisalinas	27
1.2.5 Atividades Biológicas das Fisalinas	28
1.3 Estrutura e Fisiologia da Pele.....	30
1.4 Inflamação cutânea.....	32
1.5 Dermatites	37
1.5.1 Dermatites de contato.....	37
1.6 Tratamento farmacológico das dermatites	42
1.6.1 Glicocorticóides	46
1.7 Modelos Animais de Dermatites	47
1.7.1 Dermatite de contato irritativa induzida por TPA	48
1.7.2 Dermatite de contato alérgica induzida por Oxazolona	49
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	50
3 OBJETIVO	51
3.1 Objetivo Geral	51
3.2 Objetivos específicos.....	51
4 MATERIAIS	52
4.1 Material Botânico.....	52
4.2 Animais Experimentais	52
4.3 Drogas e Reagentes	53
4.4 Equipamentos.....	54
5 MÉTODOS	55
5.1 Obtenção da Fisalina E.....	55
5.2 Dermatite de contato irritativa aguda induzida por TPA.....	57
5.3 Dermatite de contato irritativa induzida pelo uso crônico de TPA	58
5.4 Determinação da atividade de Mieloperoxidase	58
5.5 Determinação dos níveis teciduais de TNF- α	59

5.6	Análise imunohistoquímica de TNF- α e NF- κ B	59
5.7	Dermatite de contato alérgica induzida por Oxazolona	60
5.8	Determinação dos níveis teciduais de INF- γ	60
5.9	Avaliação Histopatológica	61
5.10	Análise Estatística	61
6	RESULTADOS.....	62
6.1	Obtenção da Fisalina E.....	62
6.2	Atividade da Fisalina E na dermatite de contato irritativa aguda induzida por TPA em camundongos.....	62
6.2.1	Edema de orelha induzido por TPA	62
6.2.2	Participação dos receptores esteroidais na atividade antiedematogênica da Fisalina E	65
6.2.3	Atividade de Mieloperoxidase	68
6.2.4	Níveis teciduais de TNF- α	73
6.2.5	Análise Histológica	76
6.3	Atividade da Fisalina E no modelo de dermatite crônica induzida por TPA	79
6.3.1	Edema de orelha induzido por TPA	79
6.3.2	Atividade de Mieloperoxidase	81
6.4	Análise Imunohistoquímica.....	85
6.4.1	Efeito da Fisalina E e do Antagonista Mifepristone na marcação imunohistoquímica para TNF α	85
6.4.2	Efeito da Fisalina E e do Antagonista Mifepristone na marcação imunohistoquímica para NF- κ B	87
6.5	Atividade da Fisalina E aplicada topicamente e oralmente no modelo de dermatite de contato alérgica induzida por oxazolona.....	89
6.5.1	Hiperplasia epidérmica induzida por oxazolona	89
6.5.2	Níveis teciduais de INF- γ	92
6.5.3	Análise Histológica	94
7	DISCUSSÃO	96
8	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

O uso das plantas medicinais e suas vantagens terapêuticas foram acumulados durante séculos. A arte dos chamados curandeiros, oriunda de épocas distantes, se caracterizava pela utilização de recursos naturais, como ferramenta para tratamento e cura de doenças. Ainda hoje, o conhecimento sobre plantas medicinais representa o único recurso terapêutico de várias comunidades ao redor do mundo (DI STASI, 1996). Desde épocas bastante distantes, os produtos naturais, marcadamente os extraídos de plantas, têm constituído importantes fontes de agentes terapêuticos. Estes produtos naturais revelam uma incomensurável quantidade e diversidade em termos estruturais e no tocante a propriedades físico-químicas e biológicas (WALL; WANI, 1996). A descoberta de substâncias ativas, que em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química, possuem atividade farmacológica, muitas vezes já confirmada pelo uso popular e comprovada cientificamente, gera interesses institucionais e governamentais (MIGUEL; MIGUEL, 2000).

A pesquisa de novos fármacos oriundos de plantas medicinais é bastante promissora no Brasil, por dois motivos principais: pelo ainda baixo número de espécimes vegetais explorados em termos de seu potencial terapêutico e pela vastíssima diversidade da flora brasileira. O Brasil é o país com maior diversidade genética do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total de 350.000 a 500.000 (DIAS, 1996). A pesquisa sistemática para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas; extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, as quais se caracterizam como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento (DI STASI, 1996).

O uso medicamentoso das plantas medicinais deve ser fundamentado em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que dela possam advir. E o uso dos fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a

opção de escolha terapêutica dos profissionais de saúde, no sentido de utilizar medicamentos equivalentes, igualmente registrados, possivelmente mais barato e/ou com espectro de ação mais adequados, com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes. (BRASIL, 1995).

Companhias farmacêuticas têm evidenciado que para algumas doenças complexas, os produtos naturais continuam sendo uma fonte valiosa para a síntese de novos compostos químicos por apresentarem estruturas privilegiadas selecionadas pela evolução ao longo de milhares de anos (CLARDY et al., 2004; NEWMAN et al., 2003). Das 520 drogas aprovadas entre 1983 e 1994, 39% eram produtos naturais ou derivados destes, e 60-80% dos antibacterianos e drogas anticâncer eram derivados de produtos naturais (CRAGG et al., 1997; YUE – ZHONG SHU, 1998). Atualmente cerca de 25 a 30% de todas as drogas terapêuticas disponíveis no mercado são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005).

Nos últimos anos o interesse em plantas medicinais para terapia de distúrbios dermatológicos tem crescido bastante (DATNER, 2004). Os extratos de plantas têm sido utilizados em aplicações tópicas como terapia antienvhecimento, para o tratamento de feridas e de outras doenças da pele (PAJONK et al., 2006). Como exemplos dessas plantas podemos citar a soja (*Glycine max*) (IZUMI et al., 2007), o chá verde (*Camellia sinensis*) (HSU, 2005; PAJONK et al., 2006), o mamão (*Carica papaya*) (HEWITT et al., 2000; STARLEY et al., 1999) e a babosa (*Aloe vera*) (RICHARDSON et al., 2005).

Entre as plantas usadas popularmente ou mesmo prescritas pela medicina alopática para o tratamento de dermatites podemos citar a calêndula (*Calendula officinalis*), que possui na sua composição triterpenos pentacíclicos, flavanóides e saponinas (WICHTL, 1994); a camomila (*Matricaria chamomilla*), cujo mecanismo de ação possivelmente se deve a inibição tanto da ciclooxigenase quanto da lipoxigenase comprovadas *in vitro* (AMMON; KAUL, 1992; HEILMANN et al., 1993); a hamamélis (*Hamamelis virginiana*) (TYLER, 1994), devido a sua ação adstringente, promovendo uma contração dos vasos sanguíneos, resultando em uma ação antiinflamatória local e por fim podemos citar o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), muito utilizado na medicina tradicional chinesa para o tratamento da dermatite atópica (SHEEHAN; ATHERTON, 1994; LACHMAN et al., 1996).

Muitas plantas que apresentam atividade antiinflamatória já tiveram os compostos responsáveis por tal atividade isolados e caracterizados, como por exemplo, os terpenos e flavonóides presentes na *Matricaria recutita* (apigenina, α -bisabolol e azuleno), os triterpenos da *Calêndula officinalis* (taraxasterol e o lupeol), as lactonas sesquiterpênicas da *Arnica Montana* (helenalina), os triterpenos da *Glycyrrhiza glabra* (glicirrizina ou ácido glicirrízico), *Rosmarinus officinalis* (ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido micromérico) e os sesquiterpenos da *Cordia verbenaceae* (α -humuleno) (ALTINIER et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; BLUMENTHAL, 2003; AKAMATSU et al., 1991; OKIMASU et al., 1983).

Cerca de 300 preparações de plantas medicinais destinadas ao tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, tiveram sua eficácia comprovada e seu uso tradicional validado pela agência reguladora de medicamentos da Alemanha (Comissão E), nas quais estão incluídas a *Arnica montana*, *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita*, *Echinacea sp.*, *Sanguinária canadenses*, *Hammamelis virginiana*, *Aveno sativa*, *Aloe Vera* e *Hypericum perforatum* (MEYER et al., 2005; DATNER, 2003; BEDI; SHENEFELT, 2002). No entanto, grande parte das plantas utilizadas na medicina tradicional ainda não foi submetida a estudos que comprovem sua eficácia e segurança e o uso popular não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros. Afinal, as 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 (SIMÕES et al., 2000).

1.2 Gênero *Physalis*

O comprovado potencial biológico de várias espécies do gênero *Physalis*, incluindo *P.alkekengi* e *P.angulata*, demonstra a importância do estudo de plantas deste gênero com finalidade de obtenção de substâncias com potencial terapêutico (DAMU et al., 2007; QIU et al., 2008).

O taxon *Physalis* abrange cerca de cento e vinte (120) espécies com caracteres principalmente herbáceos, que se distribuem pelas zonas temperadas do globo terrestre, especialmente nas Américas Central e do Sul, cujos principais centros de diversidade taxonômica encontram-se nos Estados Unidos e México (HAWKES et al., 1991; TOMASSINI et al., 2000).

O nome *Physalis* origina-se do grego onde “physa” significa bolha ou bexiga, referindo-se ao cálice que envolve os frutos, principal característica das plantas que compõem este taxon (HAWKES et al., 1991).

O gênero é constituído por diversas plantas de incontestável valor etnofarmacológico, as quais são utilizadas para diversas finalidades e em vários sistemas de medicina tradicional do mundo. Dada à importância medicinal, algumas espécies de *Physalis* têm sido domesticadas, como por exemplo: *P. philadelphica*, *P. peruviana* e *P. pubescens*. No **Quadro 1**, encontram-se listadas algumas espécies de *Physalis*, incluindo *Physalis angulata* e seus respectivos usos na medicina popular (HAWKES et al., 1991).

<i>Espécies</i>	<i>Etnofarmacologia</i>	<i>Referências</i>
<i>P. chenopodifolia</i>	Contra infecções gástricas e respiratórias, febre e diabetes	MALDONADO et al., 2004
<i>P. minima</i>	Diurético, tônico, purgativo e tratamento de inflamações da pele	SIN et al., 1987
<i>P. philadelphica</i>	Desordens gastrintestinais, lepra e purificação do sangue	SU et al., 2002.
<i>P. pubescens</i>	Tratamento de diabetes, malária, hepatite, doenças de pele e reumatismo	LORENZI, 2002.
<i>P. peruviana</i>	Tratamento do Câncer, malária, dermatites, reumatismo e como agente antimicrobiano e antipirético	WU et al., 2004
<i>P. angulata</i>	Tratamento de Malária, dermatite, reumatismo e asma câncer	KUO et al., 2006; DAMU et al., 2007

Quadro 1 – Etnofarmacologia do gênero *Physalis*

1.2.1 *Physalis angulata* Lin.

Physalis angulata Lin. (sinonímia: *Physalis dubia* Link, *Physalis linkiana* Nees., *Physalis ciliata* Sieb. et Zucc.) é popularmente conhecida como "camapú", "bucha de rã", "Juá de capote" ou "Mata-fome" (LORENZI, 2002).

É uma planta medicinal, anual e herbácea de origem do Norte do Brasil, também se localiza nas regiões tropicais e sub-tropicais. Na **Figura 1** percebemos que esta planta é nativa em quase todo o Brasil, cresce espontaneamente formando pequenas populações. É considerada planta daninha, capaz de infestar lavouras agrícolas, pomares e terrenos baldios. Suas sementes apresentam grande poder germinativo e seus espécimes habitam preferencialmente solos semi-úmidos e sombreados. Seus frutos de sabor doce ou insípido são comestíveis, sendo apreciados tanto pelo homem, especialmente aqueles que habitam as zonas rurais, como por animais (BRAGA, 1976; LORENZI, 2002).

P. angulata Lin. é, sem dúvida, a mais representativa das espécies do gênero *Physalis*, considerando seu valor medicinal. Integra o elenco de plantas curativas de diversos sistemas de medicina tradicional de varias partes do planeta, inclusive do Brasil, cujas propriedades medicinais são amplamente difundidas, especialmente no Nordeste do Brasil e Amazônia. Seu uso como medicinal remonta a antigas épocas, quando os índios já lançavam mão da infusão de suas folhas com fins diuréticos. Seus frutos são utilizados como diuréticos. As folhas são aplicadas contra inflamações da bexiga, do baço e contra icterícia. Sendo ainda empregadas no tratamento de malária, hepatite e dermatite. O suco é considerado calmante e depurativo, sendo empregado contra reumatismo e dores do ouvido. Algumas tribos indígenas Colombianas consideram as folhas e frutos com propriedades narcóticas, e em uso externo, o decocto destas partes é utilizado como antiinflamatório e anti-séptico para doenças de pele. Na medicina tradicional do Peru, as raízes deixadas em repouso no rum são empregadas no tratamento de diabetes (LORENZI, 2002).



Figura 1- Distribuição geográfica no Brasil de *Physalis angulata* Lin.

1.2.2 Descrição botânica de *Physalis angulata* Lin.

Planta herbácea, glabra, ramosíssima, de caules angulosos. Folhas pecioladas, ovado-oblongas, irregularmente serrado-denteadas. Flores solitárias, pequenas, amarelas, sem mácula, com anteras azuladas ou violáceas. Baga globosa, amarelo-esverdeada, envolvida completamente pelo cálice, que é ovóide, 4-anguloso, papiráceo, pendente, lembrando pequena lanterna. Frutos doces ou insípidos, comestíveis (**Figura 2**).



Figura 2- *Physalis angulata* Lin.

Fonte: http://www.missouriplants.com/Yellowalt/Physalis_angulata_page.html

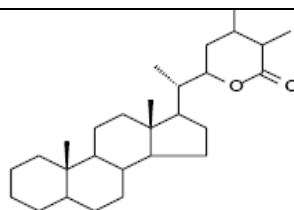
1.2.3 Constituintes químicos isolados do gênero *Physalis*

Os vitaesteróides constituem uma classe de compostos químicos bioativos denominados lactonas esteróidais (C-28) naturais, que reproduzem o esqueleto intacto ou modificado do ergostano. Estes metabólitos secundários geralmente contêm ligação dupla e na grande maioria são polioxigenados (**Figura 3**). Os vitaesteróides, como por exemplo as fisalinas podem ser originados nas plantas do gênero *Physalis* a partir de reações de oxidação e/ou hidratação que ocorreriam na própria planta.

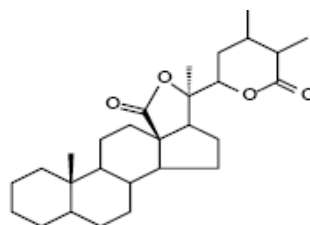
Estas peculiaridades conduzem a várias modificações da cadeia carbocíclica, bem como da cadeia lateral, resultando em compostos de exóticas e complexas feições estruturais. Como resultado desta diversidade estrutural, os vitaesteróides foram subdivididos em seis grupos principais: vitanolídos (I), vitafisalinas (II), fisalinas (III), acnistinas (IV), ixocarpalactonas (V) e perulactonas (VI), os quais podem apresentar os anéis A ou D aromatizados (**Quadro 2**).

Os vitanolídos são os mais abundantes e são considerados os precursores dos grupos III e IV. Doze gêneros da família Solanaceae são as principais fontes destes compostos: *Acnistus*, *Datura*, *Deprea*, *Iochroma*, *Jaborosa*, *Lycium*, *Nicanda*, *Salpichroa*, *Tubocapsicum*, *Witheringia*, *Withania* e *Physalis*. Sendo os dois últimos gêneros os maiores biosintetizadores destes produtos naturais. Entretanto, é importante ressaltar que os vitaesteróides são também produzidos por alguns membros das famílias Taccaceae e Leguminosae, e a partir de alguns organismos marinhos (CÁRDENAS et al., 1994; VERAS et al., 2004).

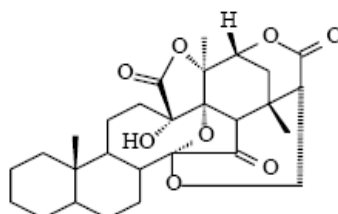
Como consequência da importância etnofarmacológica conferida por algumas espécies de *Physalis*, várias delas têm sido investigadas quimicamente, tendo sido isolados flavonóides, alcalóides, esteróides e ceramidas (BASEY et al., 1992; ISMAIL et al., 2001; SU et al., 2002). No entanto, um grupo de metabólitos secundários majoritários caracterizados como vitaesteróides, tem sido encontrado em raízes e folhas da *P. angulata* Lin. sendo denominadas de fisalinas (SOARES et al., 2003). Da *Physalis angulata* já foram isoladas e identificadas várias fisalinas como B, E, F e G (TOMASSINI et al., 2000).

Vitanolídos

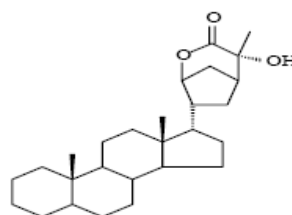
Vitanolido (I)

Vitafisalinas

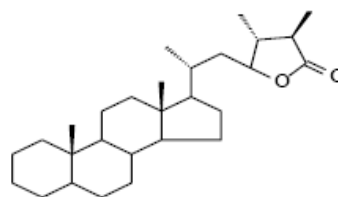
Vitafisalina (II)

Fisalinas

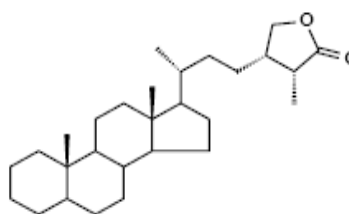
Fisalina (III)

Acnistinas

Acnistina (IV)

Isocarpalactona

Isocarpalactona (V)

Perulactona

Perulactona (VI)

Quadro 2- Principais constituintes químicos encontrados na família Solanaceae
Fonte: Tomassini et al. (2000)

1.2.4 As fisalinas

São vitaesteróides encontrados no gênero *Physalis*. Quimicamente são denominadas de lactonas sesquiterpênicas esteroidais. Constituem-se como moléculas de estruturas bastante complexa, pois além da lactona apresentam uma outra γ lactona fundida ao anel D. São derivados esteroidais do tipo 13,14 – seco 16,24 ciclo ergostano, carbonilados em C -15 (Figura 3).

Atualmente várias Fisalinas foram isoladas e identificadas, como A, B, C, D, E, F,G e H (TOMASSINI et al., 2000) (Figura 4).

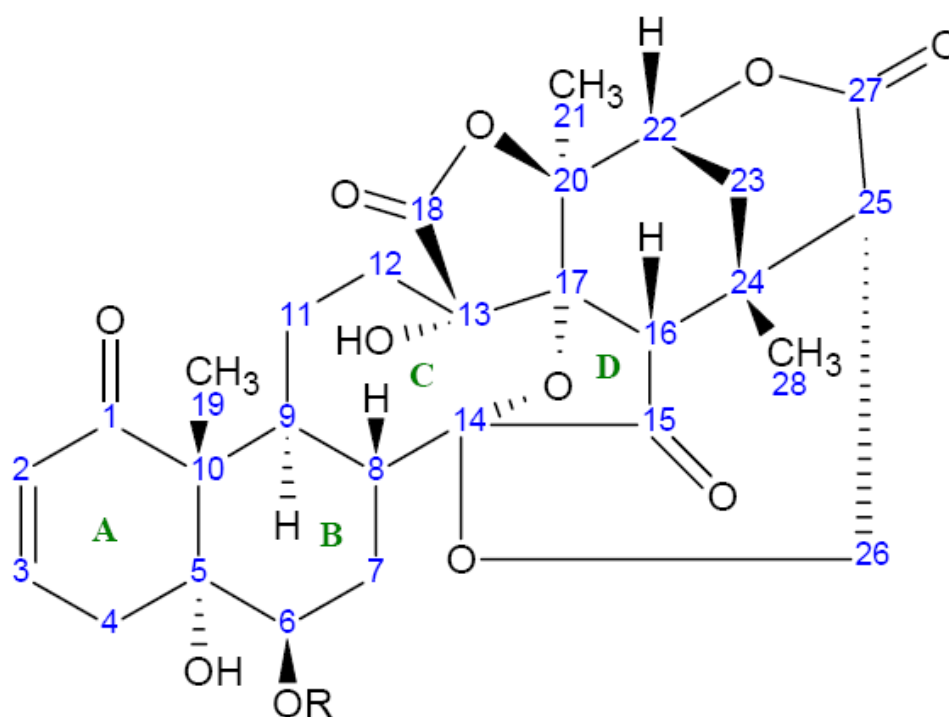
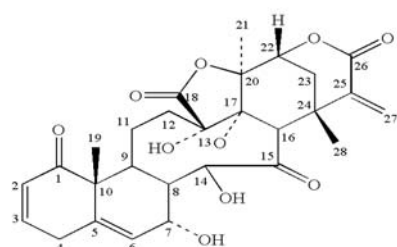
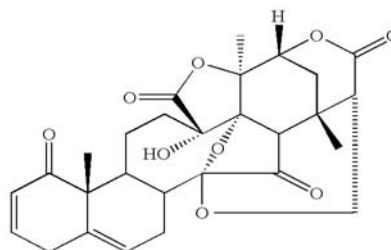
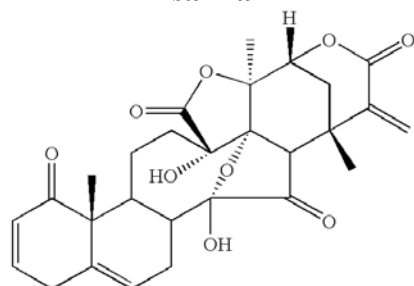
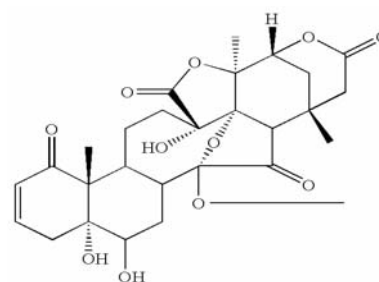
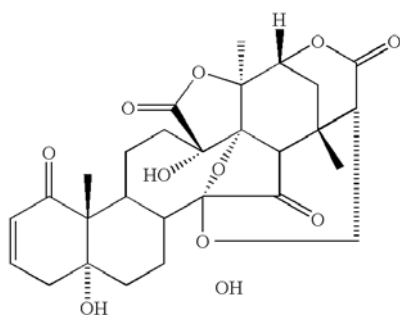
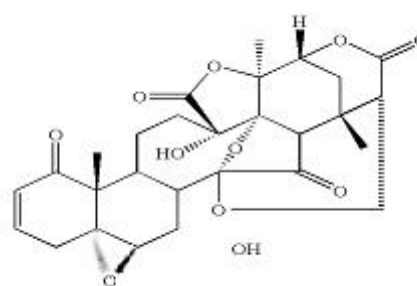
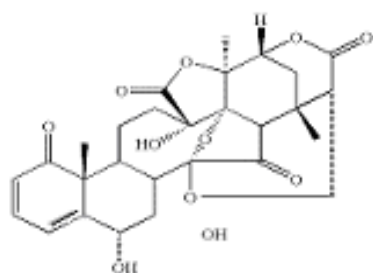
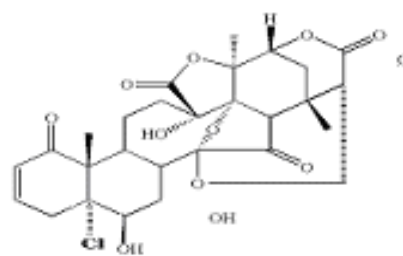


Figura 3 – Estrutura básica das fisalinas

1.2.5 Atividades Biológicas das Fisalinas

As fisalinas possuem inúmeras atividades biológicas já descritas na literatura como atividades antimicrobiana, antitumoral e antileishmanicida (CHIANG et al., 1992a, 1992b; LIN et al., 1992; CHOUDHARY et al., 2005; CHOUDHARY et al., 2007), ainda possuem atividade antiinflamatória em macrófagos associada com uma inibição da ação da produção de NO e prevenção da letalidade associada com a injeção de LPS em camundongos (SOARES et al., 2003) e antitumoral das fisalinas B e D (MAGALHÃES et al., 2006). As fisalinas B, D e F demonstraram citotoxicidade contra várias linhagens celulares (KB, A431, HCT-8, PC-3, ZR751, HONE-1 and NUGC) (KUO et al., 2006; DAMU et al., 2007), bem como apresentaram atividade inibitória sobre a ativação de NF κ B induzida por PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) *in vitro* (JACOBO-HERRERA et al., 2006) e efeito antiinflamatório em modelo de isquemia e reperfusão intestinal em camundongos, reduzindo o infiltrado de neutrófilos, o aumento de permeabilidade vascular e os níveis teciduais de TNF α (VIEIRA et al., 2005).

Também já foi comprovada atividade inibitória das fisalinas B, F e G sobre a função de linfócitos *in vitro* e prevenção da rejeição de transplante alogênico em camundongos (SOARES et al., 2006). Já foram descritas na literatura a atividade antimicrobiana de fisalina B (SILVA et al., 2005) e a atividade antileishmanicida das fisalinas B, D e F *in vivo* e *in vitro* (GUIMARÃES et al., 2009). A Fisalina B demonstrou a capacidade de inibir a via ubiquitina-proteassoma e ativação do NF- κ B (VANDENBERGUE et al., 2008). Quatro novas fisalinas, isoladas da *Physalis alkekengi*, demonstraram efeito inibitório sobre a produção de NO em macrófagos ativados por LPS (QIU et al., 2008). Contudo, apesar das fisalinas terem descritas inúmeras atividades farmacológicas, poucos são os estudos que tem descrito seus efeitos tópicos.

**Fisalina A****Fisalina B****Fisalina C****Fisalina D****Fisalina E****Fisalina F****Fisalina G****Fisalina H****Figura 4** - Estrutura Química das Fisalinas A, B, C, D, E, F, G e H

1.3 Estrutura e Fisiologia da Pele

A pele é um órgão complexo que isola e recobre aproximadamente 2 m² da superfície corpórea e representa 15% do peso corporal, sendo constituída por três camadas de 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. A estrutura, as propriedades e a composição da pele variam consideravelmente em relação à idade. O sistema tegumentar (pele e derivados epidérmicos) desempenha várias funções: protege contra lesões físicas, químicas e biológicas, impede a perda de água, promove as sensações de dor, pressão, tato e temperatura, sintetiza certos hormônios (dehidrotestosterona) e vitaminas (vitamina D), promove a regulação térmica, metaboliza xenobióticos e excreta certas substâncias através das glândulas sudoríparas (CHUONG et al., 2002; HAAKE et al., 2000; SAMPAIO et al., 2000; SHAEFER; REDELMEIER, 1996; ROSS et al., 1993) (Figura 5).

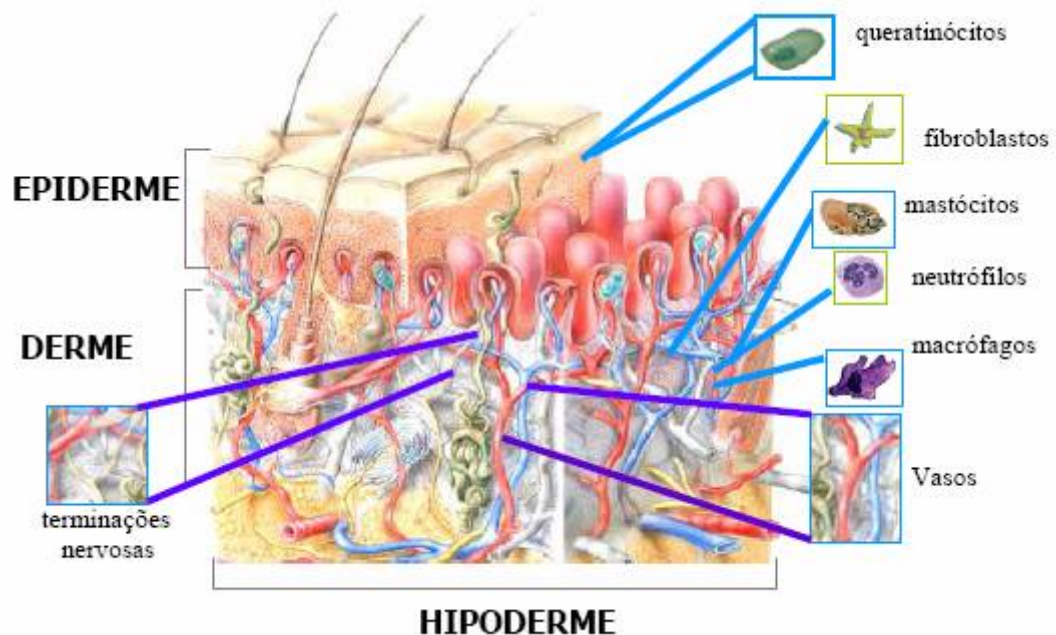


Figura 5 - Esquema simplificado de uma seção transversal de pele demonstrando as três camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e os tipos celulares presentes

Fonte: Adaptado de Freinkeil e Woodley (2001)

A camada superior da pele é a epiderme, sendo esta constituída por um epitélio estratificado pavimentoso cuja espessura apresenta variações topográficas ao longo do organismo (CANDI et al., 2005; SAMPAIO et al., 2000). A epiderme é classificada basicamente em quatro camadas (**Figura 6**), cada uma apresentando uma função distinta (NORRIS, 2004; ROSS et al., 1993):

1ª. Camada córnea - atua como uma grande barreira à penetração de organismos externos e toxinas, além de prevenir a perda de água;

2º. Estrato granuloso – nessa camada inicia-se o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose diferenciando-se em corneócitos;

3º. Estrato espinhoso – os queratinócitos presentes nessa camada 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, etc.

4º. Estrato basal - camada mais profunda responsável pela proliferação celular, sendo essa camada resistente ao processo apoptótico.

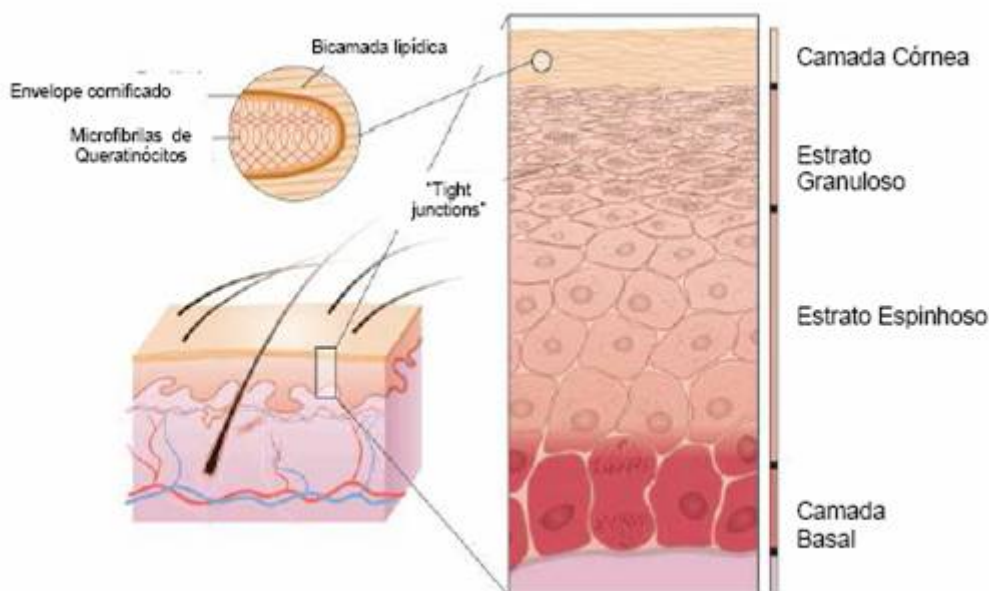


Figura 6 - Esquema simplificado de uma secção transversal da epiderme
Fonte: Adaptado de Segre (2006)

A epiderme é constituída de múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias. Aproximadamente 80-85% da epiderme é constituída de queratinócitos, 10-13 % de melanócitos, 4% de células de langerhans e 1% de células de Merckel (KOSTER; ROOP, 2004; FREINKEIL; WOODLEY, 2001).

Os queratinócitos representam o principal tipo celular presente na epiderme, sendo responsáveis pela manutenção da integridade da estrutura epidérmica. Os queratinócitos também estão envolvidos na resposta imunológica do tecido cutâneo, uma vez que expressam diferentes citocinas, quimiocinas e também moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC-II). No processo de diferenciação celular os queratinócitos passam a produzir a queratina, uma proteína resistente e impermeável que preenche as células mais superficiais da epiderme (corneócitos) e que promove força mecânica, mantêm a estrutura do queratinócito e contribui na adesão celular.

1.4 Inflamação cutânea

A pele, como interface com o meio externo, tem um papel importante de proteção, termoregulação, resposta imunológica, bem como na manutenção e desenvolvimento de defesa, uma vez que está constantemente sujeita a estímulos externos, tais como patógenos, agentes mecânicos, agentes químicos e resposta auto-imune. Tais estímulos desencadeiam uma resposta imediata de proteção ao organismo, denominada resposta inflamatória, cuja finalidade é erradicar o agente agressor, de forma a evitar sua disseminação a outras regiões do organismo, promover o reparo tecidual e restabelecer a homeostasia da pele (FIRESTEIN, 2004; BECKER, 1997). A resposta inflamatória aguda é caracterizada, a nível clínico, por quatro sinais clássicos, que incluem calor, eritema, edema e dor. Porém, uma resposta inflamatória exacerbada pode promover uma descompensação fisiológica, levando a perda de função do tecido e/ou órgão (RANG et al., 2007; SERHAN; SAVILL, 2005).

A cascata de eventos desencadeada após uma agressão ou estímulo resulta no aumento do calibre microvascular, permeabilidade vascular, do recrutamento de leucócitos, como consequência de uma interação complexa entre diferentes tipos celulares residentes no tecido cutâneo (queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais, macrófagos) e secreção de vários mediadores pró-inflamatórios (NICKLOFF; NESTLÉ, 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Os mediadores pró-inflamatórios liberados durante o processo inflamatório,

tanto pelas células residentes do tecido cutâneo quanto pelas células transitentes (neutrófilos, linfócitos, monócitos), incluem os metabólitos do ácido araquidônico, histamina, serotonina, substância P, citocinas, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre outras (SIMMONS, 2006; KUPPER, 1990a). Os queratinócitos constituem as células envolvidas na primeira linha de defesa do sistema imune cutâneo devido à produção de vários mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas, cuja produção se mostra consideravelmente aumentada após a ativação dessas células por diferentes estímulos (WILLIAMS; KUPPER, 1996). Além dos queratinócitos, outras células residentes na epiderme e derme, como fibroblastos, células endoteliais, melanócitos e macrófagos também produzem diversas citocinas mediante um estímulo (BURBACH et al., 2000; KUPPER, 1990a).

As citocinas são mediadores protéicos cujas ações envolvem o desenvolvimento da resposta imune celular e humoral, indução da inflamação, controle da proliferação e diferenciação celular, bem como a indução da cicatrização. As citocinas regulam, de forma autócrina e parácrina, a resposta imune e inflamatória através da interação com receptores específicos presentes nos queratinócitos, fibroblastos, células de langerhans, células endoteliais e linfócitos T infiltrados, promovendo a mobilização de leucócitos a partir do sangue e a ativação de outras células do tecido cutâneo (RANG et al., 2007; UCHI et al., 2000; WILLIAMS; KUPPER, 1996).

Os queratinócitos produzem uma variedade de citocinas, incluindo as interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF- α), fatores de crescimento, o fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e algumas quimiocinas (UCHI et al., 2000). No entanto, entre todas as citocinas produzidas pelos queratinócitos, somente as primárias (IL-1 α , IL-1- β e TNF- α) ativam um número suficiente de mecanismos efetores capazes de desencadear uma resposta inflamatória cutânea (KUPPER, 1990). A epiderme contém uma grande quantidade de IL-1 α pré-formada e ativa, além de uma quantidade significativa de IL-1 β imatura, ambas armazenadas a nível intracelular, mas frente a um estímulo ou dano celular essas citocinas são liberadas, atuando seguidamente nos seus receptores específicos, como o receptor IL-1 tipo 1 (GROVES et al., 1996; MIZUTANI et al., 1991). Contrário à IL-1 α , a produção constitutiva das outras citocinas é mínima ou até mesmo indetectável, mas a expressão, produção e liberação das citocinas para o meio extracelular pode ser induzida por uma variedade de estímulos exógenos (WILMER et al., 1994).

As citocinas primárias desempenham um importante papel na homeostasia e na modulação da resposta inata e imune da pele frente a agentes nocivos (vírus, fungos, bactérias, agentes químicos e radiação UV), considerando que estas citocinas são potentes iniciadores do processo inflamatório e de reparo com ampla atividade biológica, incluindo a ativação das células endoteliais e a indução de várias citocinas secundárias algumas delas com ação quimiotática e ativadora de leucócitos (BURBACH et al., 2000; UCHI et al., 2000; GROVES et al., 1996; WILLIAMS; KUPPER, 1996; WILMER et al., 1994).

A exposição celular as citocinas primárias (IL-1 e TNF- α) resulta na ativação de algumas vias de sinalização, como das proteínas quinases (PKC, PKA) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que culmina na estimulação da atividade de alguns fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB) e a proteína ativadora-1 (AP-1). Estes fatores de transcrição quando ativados induzem a transcrição gênica de diversas citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGFB1- fator de crescimento tumoral), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios secundários, como a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2) (PASCUAL; GLASS, 2006; DELHASE, 2003; WINYARD, 2003; BARNES; KARIN, 1997). Assim, a principal função da IL-1 e do TNF- α , é desencadear a resposta inflamatória inata e atuar como uma molécula co-estimulatória da resposta imunológica (UCHI et al., 2000).

Além disso, o TNF- α também tem um papel importante no processo de remodelação do tecido após um dano, pois atua como fator angiogênico e como fator de crescimento dos fibroblastos (BURBACH et al., 2000). Entre as citocinas secundárias convém destacar a IL-8, um potente agente quimiotático responsável pelo recrutamento de leucócitos, preferencialmente os neutrófilos. Essa quimiocina estimula o movimento dos leucócitos e regula a migração destes do sangue para a região extravascular (SCHRAMM; THORLACIUS, 2004). Assim, a IL-8 coopera com a IL-1 e TNF- α no processo de infiltração leucocitária, considerando que a IL-1 e TNF- α induzem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, o que é um prelúdio à migração leucocitária ao local lesado (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Além das citocinas, os metabólitos do ácido araquidônico (prostanóides) também desempenham um papel importante no processo inflamatório cutâneo. Estes mediadores possuem uma ampla ação mediada por receptores específicos presentes em células-alvo. Na

pele, sabe-se que os prostanóides são produzidos abundantemente e que os seus receptores também estão expressos de forma considerável. No entanto, o papel fisiológico dos prostanóides no tecido cutâneo ainda não está totalmente esclarecido (KABASHIMA; MIYACHI, 2004).

A produção das prostaglandinas e dos leucotrienos é iniciada com a liberação do ácido araquidônico a partir dos fosfolipídios de membrana, uma reação catalisada pela fosfolipase A2 (PLA2). A PLA2 é ativada em resposta a vários estímulos, tais como: ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento C5a (C5a) nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diferentes agentes (EROs, UV-B, agentes químicos, etc) (RANG et al., 2007). O AA uma vez liberado serve de substrato para as duas isoformas da enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2), onde é convertido em prostaglandinas e tromboxanos (PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2, TXA2), e também para a 5-lipoxigenase (5-LOX), sendo por essa via metabólica convertido em leucotrienos (LTB4, LTC4, LTD4, LTE4). Na pele normal, a COX-1 está distribuída em toda a epiderme, enquanto a COX-2 se localiza principalmente nos queratinócitos supra-basais, sendo essa isoforma prontamente induzida frente a um estímulo inflamatório. A prostaglandina E2 (PGE2) é a principal prostaglandina presente no tecido cutâneo, onde modula vários eventos inflamatórios, como o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, contribuindo assim na formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos. No entanto, o tráfego dos linfócitos a partir do lúmen pós-capilar para o espaço intersticial já é um processo mediado em parte pelo LTB4 (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; LEE et al., 2003). As PGE2 e PGD2, por sua vez, induzem a transcrição de enzimas requeridas para a síntese de uma outra classe de eicosanóides envolvidas na fase de resolução da fase inflamatória, como as lipoxinas (SERHAN; SAVILL, 2005).

Outros mediadores químicos também desempenham uma ação importante durante o processo inflamatório cutâneo como, por exemplo, a histamina. A histamina atua em muitos processos fisiológicos celulares, mas também intervêm nas reações alérgicas e na inflamação, sendo esse um dos principais motivos dos mastócitos estarem estrategicamente localizados na microvasculatura dos tecidos que estão em contato com o meio externo, como a pele, os pulmões e intestinos. A liberação da histamina ocorre pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. Após a degranulação dos

mastócitos, a histamina atua em receptores específicos (receptores histaminérgicos) promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido (RANG et al., 2007; SCHARAMM; THORLACIUS, 2004; SILVA; CARVALHO, 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outros mediadores químicos como a serotonina, substância P e neurocinina A também participam da regulação dos processos vasculares, contribuindo assim na resposta inflamatória (HOLZER, 1991).

A função coordenada da população celular presente na derme e epiderme permite que ocorra uma resposta rápida e efetiva frente à variedade de estímulos que ocorrem na interface entre o organismo e o meio externo (WILLIAMS; KUPPER, 1996). Assim, num estado fisiológico normal a resposta inflamatória é benéfica, uma vez que protege o tecido contra danos, por exemplo, na defesa contra tumores e infecções. No entanto, a falha de algum dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória pode fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, perca o controle e desregule a homeostase do tecido, predispondo o mesmo a desenvolver um processo inflamatório crônico.

A instalação de um processo inflamatório crônico tem sido considerada a base de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, asma, esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença de Alzheimer, câncer e algumas doenças cutâneas como dermatites e psoríase (MUELLER, 2006; DEBENEDICTIS et al., 2001; ROBERT; KUPPER, 1999). Desta forma, é necessária a manutenção do equilíbrio entre os efeitos benéficos da inflamação e o seu potencial de persistência que, a longo prazo, pode ser deletério por promover a destruição tecidual (SIMMONS, 2006).

1.5 Dermatites

As dermatites são dermatoses inflamatórias mediadas por fatores imunológicos locais ou sistêmicos, embora as causas de muitas delas permaneçam desconhecidas. Em geral as lesões agudas permanecem por alguns dias a semanas e se caracterizam por inflamação, edema e, em algumas, lesão epidérmica, vascular ou subcutânea. Por outro lado, as lesões crônicas persistem

por meses a anos e, com freqüência, exibem componentes significativos de crescimento epidérmico alterado (atrofia ou hiperplasia) ou fibrose dérmica (MURPHY; MIHM JR., 2000).

Como exemplos das dermatoses mais comumente encontradas dentro da categoria aguda, temos a urticária, a dermatite eczematosa aguda (que inclui a dermatite de contato, a dermatite atópica, dermatite eczematosa relacionada a drogas, erupção fotoeczematosa e dermatite irritante primária) e o eritema multiforme e como exemplo de dermatoses crônicas, pode-se citar a psoríase, o líquen plano e o lúpus eritematoso (MURPHY; MIHM JR., 2000).

A dermatite atópica é uma doença inflamatória cutânea crônica, associada a fatores genéticos e a predisposição a produzir resposta mediadas por IgE a alérgenos ambientais, constituindo uma das manifestações das doenças atópicas, junto com asma e rinite alérgica (LEITE et al., 2007).

Pode-se dividir as dermatites em: dermatite de contato, dermatite seborréia, dermatite nummular e dermatite atópica (SAMPAIO, 2002). Os alvos deste trabalho de pesquisa são a dermatite de contato irritativa quanto alérgica.

1.5.1 Dermatites de contato

A dermatite de contato é uma desordem caracterizada por inflamação e prurido na pele (BÁNVÖLGYI et al., 2005) e causada por agentes externos que podem ser divididos em substâncias irritantes, que possuem uma ação tóxica direta na pele (dermatite de contato irritativa, DCI), e compostos alergênicos que provocam uma reação de hipersensibilidade tipo tardia (dermatite de contato alérgica, DCA) (ENGLISH, 2004). É uma dermatose inflamatória freqüente nos países industrializados, com grande impacto socioeconômico, sendo uma das doenças ocupacionais mais comuns (SAINT-MEZARD et al., 2004; BELSITO, 2000).

A incidência anual das dermatites de contato ocupacionais (DCO), de acordo com os dermatologistas do projeto EPIDERM (Reino Unido), é de cerca de 1,3 casos em 10.000 trabalhadores (CHERRY et al., 2000). As indústrias de manufaturados contribuem para o maior número de casos encontrados seguidas das profissões da área de saúde. O impacto econômico das DCO é considerável. Aproximadamente 4 milhões de dias de trabalho são perdidos devido a abstenção causada pelas doenças de pele (ENGLISH, 2001), o que pode custar cerca 200

milhões de euros (ENGLISH, 2004). Além disso, as DCO produzem um impacto considerável na qualidade de vida das vítimas da doença (HUTCHINGS et al., 2001).

1.5.1.1 Dermatite de Contato Irritativa

A dermatite de contato irritativa (DCI) é uma resposta da pele a uma variedade de estímulos externos que induzem inflamação sem, no entanto promover a produção de anticorpos específicos, mas as lesões produzem perda da integridade da pele e podem permitir absorção das proteínas e sensibilização posterior. Este tipo de dermatite apresenta as mesmas características morfológicas de outras dermatites, com menos vesículas e, mais infiltrado neutrofílico (SMITH et al., 2002).

O contexto de desenvolvimento da DCI depende de vários fatores que podem ser caracterizados como internos ou externos (LEVIN; MAIBACH, 2002). Os fatores externos são as características da molécula causadora, o tempo de exposição, o efeito cumulativo com outro irritante e as condições ambientais (PROTTEY et al., 1972; AGNER; SERUP, 1989). Enquanto que as características internas dizem respeito à susceptibilidade individual dos pacientes, como raça (BERARDESCA; MAIBACH, 1988; WEIGAND et al., 1974; SUGINO et al., 1993), idade (LEVEQUE et al., 1984), sexo (LAMMINTAUSTA; MAIBACH; WILSON, 1987) e estória prévia de dermatite (LAMMINTAUSTA; MAIBACH; WILSON, 1988).

A irritação aguda da pele resulta da exposição a um irritante forte ou a produtos químicos cáusticos como soluções ácidas e alcalinas (EICHMANN; AMGWERD, 1992). A sensação imediata do paciente após o contato é queimação e coceira e os sinais clínicos incluem eritema, edema e necrose (LEVIN; MAIBACH, 2002).

A causa mais comum de DCI é a exposição repetitiva da pele à água, detergentes, álcalis e a outros agentes químicos. Estudos mostram uma relação direta entre a frequência de lavagens das mãos e o surgimento de eczemas (FEINGOLD; ELIAS, 2000; ELIAS; FEINGOLD, 2001). Outra forma muito frequente é a DCI por produtos cosméticos (NICKOLOFF, 1998; DOGRA et al., 2003). Um estudo realizado na Suécia, com 1075 participantes mostrou que 47% destes apresentaram reações adversas na pele, como a dermatite irritativa, à produtos cosméticos (LINDBERG et al., 2004).

Enquanto a dermatite de contato irritativa aguda ocorre após uma única exposição a um forte irritante, o contato repetitivo com um irritante médio pode causar uma dermatite crônica (MALTEN, 1981).

O mecanismo da DCI crônica é bem diferente. Uma reação subaguda com nenhuma irritação visível pode se desenvolver após uma exposição crônica a um irritante, reação esta normalmente cumulativa, sem eritema e que pode ser exacerbada pelo meio ambiente. O papel do estrato córneo é fundamental pois a patologia provoca um dano progressivo na função de barreira na pele (MALTEN, 1981). A forma crônica se caracteriza por aumentar o *turnover* da epiderme, que corresponde clinicamente a liquenificação (BERARDESCA; DISTANTE, 1994).

Ocorrem três mudanças patofisiológicas na DCI: a destruição da barreira da pele, as mudanças nas células epidérmicas e a liberação de mediadores, todos eles interligados (SMITH et al., 2002). Entre os mediadores envolvidos da dermatite de contato irritativa pode-se citar o TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-1a, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, MIP-2 com predominância das células CD4+ sobre as CD8+ (LEVIN; MAIBACH, 2002).

1.5.1.2 Dermatite de contato alérgica

A dermatite de contato alérgica, também conhecida como hipersensibilidade de contato, é uma desordem da pele dependente de células T com a cinética de uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (GRABBE; SCHWARZ, 1998). Os antígenos sensibilizantes, também chamados de haptenos, são moléculas instáveis, de baixo peso molecular que não são imunogênicas *per se* tendo que se ligar a proteínas da epiderme do hospedeiro (SAINT-MEZARD et al., 2004).

A fisiopatologia da DCA consiste em duas etapas distintas: A fase de sensibilização e a fase efetora. Na primeira fase o hapteno penetra o estrato córneo, o que ativa a imunidade inata induzindo a produção de citocinas pelas células residentes da derme e epiderme ou ativa diretamente a via do NF- κ B no endotélio (SAINT-MEZARD et al., 2004; BARNES; KARIN, 1997). Em ambos os casos, as moléculas de adesão são expressas e as citocinas são sintetizadas, estes sinais favorecem a migração das células dendríticas que drenam os

sensibilizantes modificados para os linfonodos e os apresentam as células T (ROBERT; KUPPER, 1999).

Alguns dias após a sensibilização, novas células T sofrem clonagem e adquirem antígenos linfocitários cutâneos (CLA) específicos e então se tornam células de memória que deixam os linfonodos para adentrar no sangue periférico (SANTAMARIA BABI et al., 1995; SAINT-MEZARD et al., 2004).

Exposições repetidas ao antígeno sensibilizante levam à fase efetora, onde o número de células T CLA de memória específicas no sangue periférico chegam até níveis necessários pra desencadear uma resposta alérgica da pele. Estas novas células T CLA extravasam para o local da irritação, reconhecem o antígeno *in situ* e se tornam ativadas. As células T CD8+ iniciam o processo inflamatório provocando apoptose dos queratinócitos e produção de citocinas, este quadro é responsável pelo recrutamento dos leucócitos, incluindo as células T CD4+ reguladoras do sangue para a pele levando ao desenvolvimento de lesões cutâneas características da dermatite de contato alérgica (ROBERT; KUPPER, 1999; SAINT-MEZARD et al., 2004).

Encontros subseqüentes com o antígeno, mesmo que sejam meses após a sensibilização, irá novamente levar ao recrutamento das células T CLA para o sangue periférico, que agora incluem células T de memória específicas para aquele antígeno. O extravasamento das células T, seguido da ativação do receptor de antígeno e liberação de citocinas, leva a uma “lembrança” das características clínicas da DCA (**Figura 7**) (ROBERT; KUPPER, 1999).

São mediadores da DCA o TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-1a, IL-6, IP-10, MIP-2, IL-1b, IL-4. Além disso, na DCI há uma prevalência as células T CD4+, em relação a TCD8+ (LEVIN; MAIBACH, 2002).

Na **Figura 7**, observamos o mecanismo fisiopatológico da DCA, em que se destacam duas fases: fase sensibilização em que o hapteno entra em contato com a pele, é apresentado pelas células de Langerhans, que expressam na sua superfície celular o antígeno junto com complexo MHC-II, sendo drenado para o linfonodo para que células T de memória sejam produzidas e fiquem circulando no sangue periférico. A segunda fase da DCA é a fase efetora, em que o antígeno entra em contato novamente com o organismo, e as células T de memória

vão reconhecer o antígeno e induzir recrutamento de células inflamatórias e desencadeamento da dermatite de contato alérgica (ROBERT; KUPPER, 1999; SAINT-MEZARD et al., 2004).

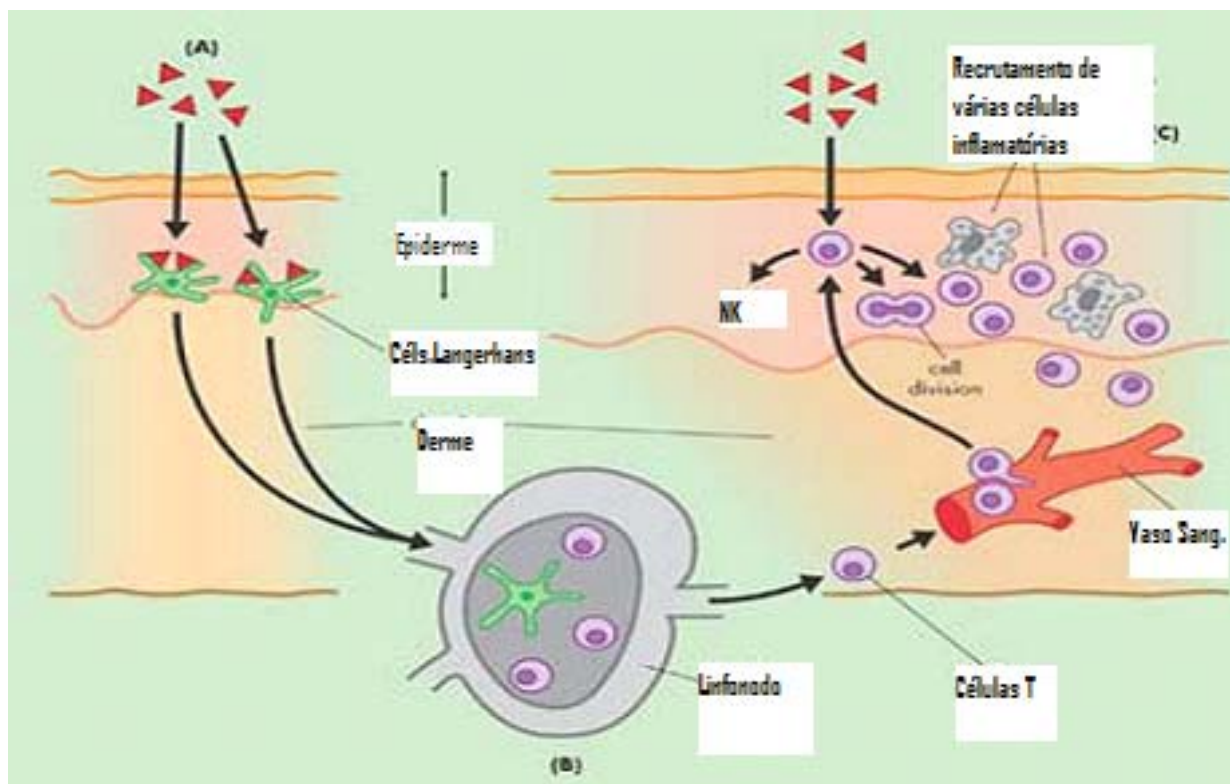


Figura 7 - Mecanismo fisiopatológico da dermatite de contato alérgica

Fonte: <http://www.abpi.org.uk>

Muitas vezes a apresentação clínica da DCI é indistinguível da DCA o que torna o diagnóstico difícil e muitas vezes errôneo (ELIAS et al., 1998). A seguir, os principais aspectos clínicos que ajudam a diferenciar os tipos de dermatites em irritativa e alérgica.

Dermatite de contato irritativa (DCI) - Ressecamento da pele na área de contato e descamação com ou sem eritema. Pode evoluir com fissuras e sangramentos. É importante salientar que o processo irritativo irá depender do agente causal.

Dermatite de contato alérgica (DCA) - Presença de eritema, edema e vesiculação. Ao se cronificar, verifica-se a formação de crostas serosas podendo ocorrer infecção secundária e, às vezes, liquenificação.

O prurido é um sintoma comum às duas patologias (BURKHART; BURKHART, 2003; SAINT-MEZARD et al., 2004) e provoca um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (LOVELL; VENDER, 2007). A histamina, a substância P e o fator de necrose tumoral possuem papel importante na percepção do prurido (WELDON, 2007).

Existe uma distinção muito útil na diferenciação das dermatites que é o período de recuperação. A recuperação na DCI é descrita como um fenômeno decrescente onde a irritação atinge rapidamente um pico e imediatamente após a retirada do contato com o irritante ocorre a melhora (WIGGER-ALBERTI; ELSNER, 2000).

Se o médico ainda tiver dúvidas no diagnóstico apenas com a observação do quadro clínico um teste de contato (patch test) pode ser realizado. O mecanismo etiogênico dos testes de contato é o mesmo da dermatite alérgica de contato. Ao se aplicar um teste epicutâneo, objetiva-se induzir no paciente a segunda fase da dermatite alérgica de contato, ou seja, a via eferente da reação imunológica do tipo IV. Com isso, frente a um teste positivo, espera-se encontrar, no local da aplicação do teste, uma reação eczematosa de intensidade variável de acordo com a resposta do indivíduo. É um teste útil na diferenciação dos tipos de dermatoses (DUARTE et al., 2000) e possui especificidade e sensibilidade entre 70 e 80% (NETHERCOTT, 1989).

1.6 Tratamento farmacológico das dermatites

A pele é um órgão ímpar no sentido de ser facilmente acessível para diagnóstico e tratamento de doenças. Para a maioria das afecções dermatológicas, o sucesso ou fracasso dos esquemas terapêuticos é rapidamente aparente tanto para o paciente quanto para o médico. Os medicamentos podem ser administrados para a pele de modo eficaz por via tópica, intralesional e sistêmica (GOODMAN; GILMAN, 2006). Nas dermatites de contato a primeira providência a ser tomada, independente se alérgica, irritativa, aguda ou crônica, é abolir o contato do agente etiológico com a pele seguindo com o tratamento terapêutico (DUARTE et al., 2000; COHEN; HEIDARY, 2004).

A dermatite de contato irritativa é freqüentemente tratada com compressas frias, corticosteróides tópicos ou, mais recentemente, antibióticos macrolídeos. As compressas frias de solução de acetato de alumínio, nitrato de prata, salina ou água reduzem a vesiculação (LEVIN; MAIBACH, 2001).

Os hidratantes ou cremes de barreira geralmente são usados em quadros subagudos (LODEN; LINDBERG, 1991; BLICHMANN et al., 1989), exercendo o seu efeito por atrair água, aumentando a hidratação da pele (LODEN, 1997). Os lipídios contidos nesses produtos agem como emulsificantes melhorando a função de barreira da pele (KUNTZ; BRASSFIELD, 1971; ASHTON et al., 1971), além de prevenir a absorção de substâncias exógenas (GHADIALLY et al., 1992). Nos casos crônicos, cremes hidratantes, como uréia 10%, cremes com silicone a 10% e outros ajudam na hidratação e proteção da pele (SITTART; PIRES, 1998).

Corticóides tópicos na forma de cremes ou pomadas devem ser utilizados para o controle da dermatose. Corticóides sistêmicos são raramente empregados. Nos casos em que haja associação com dermatite atópica, os anti-histamínicos são necessários como paliativos devido as suas propriedades antipruriginosas e sedativas, dando preferência aos agentes clássicos como difenidramina, meclastina ou hidroxizina (FUNK; MAIBACH, 1994; SITTART; PIRES, 1998; SAMPAIO; RIVITTI, 1998). A eficácia dos corticosteroides tópicos no tratamento da DCI permanece “sub judice”. Enquanto o seu efeito antiinflamatório contribui com a diminuição da inflamação e/ou da irritação, seu efeito anti-proliferativo impede a recuperação da barreira do estrato córneo (LEVIN; MAIBACH, 2000), mas a sua eficácia na DCA já foi exaustivamente comprovada (QUEILLE-ROUSSEL et al., 1990), constituindo o tratamento de escolha (LEUNG et al., 2004).

O uso oral e tópico destes agentes geralmente é bem tolerado quando por períodos curtos. Os corticosteróides por via tópica são bastante utilizados para tratamento de dermatite de contato irritativa e alérgica, por possuírem atividade antiinflamatória e imunossupressora. Em especial na dermatite de contato alérgica, os corticosteróides são úteis por causarem uma supressão no sistema imunológico, resultando em redução na ativação de linfócitos T e B, e diminuindo a produção de anticorpos. Embora possua inúmeros efeitos benéficos, o uso prolongado de esteróides tópicos pode resultar em atrofia cutânea, hirsutismo, acne, foliculite e absorção sistêmica (COHEN; HEIDARY, 2004).

Os antibióticos macrolídeos melhoram o quadro de dermatite por causar imunossupressão (DUMONT et al., 1990; SMITH, 2000); inibindo a imunoglobulina E (IgE) que medeia a liberação de histamina e outros mediadores inflamatórios dos mastócitos, reduzindo assim o prurido (LEVIN; MAIBACH, 2002).

Os agentes imunossupressores são utilizados no tratamento de afecções cutâneas que tenham em sua patogênese o envolvimento do sistema imune 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 – interferon). A terapia tópica com esses agentes imunomoduladores já se mostrou efetiva em diversas condições dermatológicas, como na dermatite atópica, dermatite de contato, dermatite seborreica, etc (SKINNER, 2005).

O micofenolato de mofetila tem sido cada vez mais utilizado no tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes na dermatologia, sendo útil como agente poupador do uso de glicocorticóides em certas condições dermatológicas como distúrbios bolhosos auto-imunes, incluindo o pênfigo vulgar. Também é eficaz no tratamento de doenças inflamatórias como a psoríase, dermatite atópica e piodermia gangrenosa (FOX et al., 2006).

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).

Os fármacos anticitocinas representam um dos maiores avanços no tratamento de doenças inflamatórias crônicas graves nos últimos anos (RANG et al., 2007).Esses fármacos tem como alvo moléculas de superfície das células T (ex.: Efalizumab e Alefacept) ou 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, além dos efeitos colaterais que esses medicamentos podem provocar (TAN et al., 2007; SIMMONS, 2006; WERTH, 2006; SCHEINBERG, 2008).

Apesar dos vários benefícios dos fármacos anticitocinas, nenhuma dessas medicações é isenta de efeitos adversos, desde os efeitos infusionais na forma endovenosa e irritações locais na administração subcutânea, à maior incidência de infecções virais e organismos oportunistas, além de já ter sido identificada uma maior incidência do aparecimento de tuberculose primária ou reativação da forma latente. Também já foram verificadas o aparecimento de placas de psoríase ou lesões palmo pustulosas após o uso prolongado de anti-TNF, o paradoxo decorre do fato que estas medicações são utilizadas para o tratamento da psoríase (SCHEINBERG, 2008).

O prurido é um dos sintomas mais comuns das dermatites e que causa um grave impacto na qualidade de vida dos pacientes, dentro deste contexto os agentes antiprurido são medicamentos bastante utilizado para controlar tal sintoma. Os antihistaminicos constituem drogas mais utilizadas para combater o prurido. Novos agentes antipruridos estão sendo desenvolvidos como os anticorpos contra interleucina 31, que parece ser uma citocina envolvida no prurido (KATOH, 2009).

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 (SKINNER, 2005; NICKOLOFF; NESTLE, 2004). No entanto, os glicocorticóides ainda são os agentes antiinflamatórios mais empregados no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, devido aos seus efeitos sobre a resposta imune e sua ação antiinflamatória. Porém, o uso contínuo dos glicocorticóides é frequentemente acompanhado de efeitos colaterais severos e muitas vezes irreversíveis, incluindo a atrofia cutânea, telangiectasias, hipertricose, alterações no processo de cicatrização, Síndrome de Cushing, entre outros (SCHOEPE et al., 2006; SCHÄCKE et al., 2002).

Mesmo com o arsenal de agentes antiinflamatórios e imunossupressores disponíveis, alguns fatores comprometem a adesão do paciente ao tratamento como o esquema posológico, efeitos adversos indesejáveis, custo elevado do tratamento, etc (GOTTLIEB, 2005; LEUNG et al. 2004). Além disso, alguns medicamentos não atingem a eficácia desejada ou comprometem a resposta imunológica, aumentando o risco a infecções e a emergência de linhagens celulares

malignas (RANG et al., 2007; FOX et al., 2006; DISEPIO et al., 1999). Assim, tanto a academia quanto a indústria farmacêutica tem voltado sua atenção aos produtos naturais, na busca de um fármaco efetivo no tratamento das doenças inflamatórias cutâneas e com efeitos adversos reduzidos.

1.6.1 Glicocorticóides

Os glicocorticóides são drogas amplamente usadas em função de seus efeitos imunossupressivos e antiinflamatórios no tratamento de muitas doenças inflamatórias, incluindo dermatites. Contudo, seu uso é muitas vezes limitado por numerosas reações adversas que provoca. Desde os primeiros estudos que demonstraram excelente resposta antiinflamatória da cortisona em pacientes com artrite reumatóide (POLLEY, 1976), já havia sido observado que seu uso não era isento de importantes efeitos adversos, principalmente, quando utilizados indiscriminadamente em doses altas e por longos períodos. Embora sua denominação tenha origem em seu efeito característico sobre o metabolismo dos carboidratos, os GC atuam praticamente sobre todos os órgãos e tecidos.

O mecanismo fundamental que promove a transativação ou a transrepressão gênica inicia-se com o hormônio, que é lipofílico, cruzando a membrana citoplasmática da célula-alvo por difusão passiva. No citoplasma os GC ligam-se a receptores protéicos específicos – os receptores de GC (RGC) – que são proteínas citoplasmáticas com estrutura contendo domínios comuns a outros membros da superfamília de receptores nucleares (WRIGHT et al., 1993). Atuam como fatores de transcrição, alterando a expressão dos genes alvo em resposta a um sinal hormonal específico (DE KLOET et al., 1993). O complexo glicocorticóide-receptor sofre transformação estrutural e se torna capaz de penetrar no núcleo celular no qual se liga a regiões promotoras de certos genes, denominadas elementos responsivos aos GC, induzindo a síntese, não somente de proteínas antiinflamatórias, como a lipocortina-1 e I κ B, mas também de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico (por exemplo, proteínas que promovem gliconeogênese). Este processo é chamado de transativação. Os GC medeiam não só a transativação, mas também a transinibição, como por exemplo estes esteróides inibem a síntese de colágeno provocando atrofia da pele, que é um importante efeito colateral dos GC (KATOH, 2009). Os GC também atuam por meio do mecanismo genômico chamado de transrepressão em que monômeros de moléculas de GC e receptores de GC interagem com fatores de transcrição,

como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear kB (NF-kB), por interação proteína-proteína e promovem efeito inibitório de suas funções.

O NF- kB é um heterodímero composto de duas subunidades p50 e p65. A ativação do NF-kB é regulada por um inibidor citoplasmático, IκB, que formam um complexo que fica localizado no citoplasma, quando a célula é estimulada (por vírus, TPA, ROS, citocinas), IκB kinase é ativada e fosforila o IκB que sofre degradação, o NF-kB é translocado para o núcleo, onde se liga a locais específicos no DNA, estimulando a transcrição gênica de citocinas, moléculas de adesão e enzimas pró-inflamatórias, que contribuem para processo inflamatório, recrutamento de células, reparo celular e ativação de células do sistema imune (GHOSH et al., 1998).

Diversos estudos têm demonstrado que a maior parte dos efeitos clínicos procurados ao se administrar um GC, ou seja, o efeito antiinflamatório e o efeito imunossupressor, são desencadeados por mecanismos de transrepressão, enquanto que grande parte dos efeitos adversos é relacionada aos mecanismos de transativação (ANTI et al., 2008).

1.7 Modelos Animais de Dermatites

Modelos animais que simulam as doenças dermatológicas humanas são necessários para permitir aos pesquisadores estudar e entender a eficácia das drogas com possíveis utilizações na clínica. Tais modelos possibilitam estudar sistemas mais complexos, como o sistema imune relacionado à pele. O modelo ideal de doença deve incluir todas as características que queremos estudar como os traços clínicos, imunológicos, celulares, moleculares e genéticos. Evidentemente que existem diferenças estruturais entre a pele do humano e a de outras espécies animais, como roedores, assim torna-se quase impossível uma identificação perfeita, mas nos permitem ter uma previsão do potencial terapêutico de um novo fármaco (PETERSEN, 2006).

Para o estudo de drogas cujo mecanismo de ação ainda não foi elucidado, o modelo deve fornecer os marcadores da doença humana que se planeja tratar. Alguns modelos podem não serem úteis para a escolha de novas drogas, no entanto podem se apresentar como uma ótima ferramenta para a descoberta das vias de sinalização envolvidas nas doenças e para expandir os conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos nas mesmas. A aplicação dos modelos de

doenças dermatológicas depende da questão a ser respondida sobre o alvo biológico ou da droga que está sendo avaliada, atualmente existem vários modelos animais de dermatite induzido por vários agentes flogísticos, como óleo de cróton, TPA, ácido araquidônico, capsaicina, oxazolona, etc. (PETERSEN, 2006).

Atualmente as terapias mais eficazes e mais utilizadas dentro da dermatologia são os corticosteróides e os inibidores da calcineurina. Ambas as classes incluem drogas potentes com atividade antiinflamatória e imunossupressora. Como a maioria dos modelos de doenças dermatológicas possui base inflamatória ou imunológica, essas drogas atuam como compostos de referência, servindo como um controle interno de qualidade e reprodutibilidade do estudo além de permitir a comparação da eficácia de novas terapias (PETERSEN, 2006).

1.7.1 Dermatite de contato irritativa induzida por TPA

Os ésteres de forbol, como o 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (TPA), são substâncias pró-inflamatórias e promotoras de tumores que ocorrem naturalmente em plantas da família Euforbiacea (EVANS; SOPER, 1978). Estes compostos induzem eritema na pele do camundongo após 1 hora da aplicação, e numa fase mais tardia induzem edema e eventualmente, hiperplasia (EVANS; SCHMIDT, 1979; RAICK et al., 1972; JANOFF et al., 1970).

O edema de orelha em camundongos induzido pelo TPA é largamente utilizado como modelo para testar a atividade antiinflamatória de drogas. Neste modelo o edema de pele é associado com um aumento na concentração de eicosanóides e leucotrienos (RAO et al., 1993; PUIGNERO; QUERALT, 1997), com ativação da proteína quinase C (PKC) (WANG et al., 2001), assim como da fosfolipase A2, indução da cicloxigenase (SCHOLZ et al., 1995; SANCHEZ; MORENO, 1999), formação de TNF- α e de infiltrado neutrofílicos (MURAKAWA et al., 2006) e translocação e ativação da lipooxigenase (WERZ et al., 2001). Uma única aplicação de TPA na orelha de roedores provoca resposta similar a uma DCI, representando um bom modelo animal da doença (SHEU et al., 2002).

1.7.2 Dermatite de contato alérgica induzida por Oxazolona

A dermatite de contato alérgica é definida como uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia que envolve duas fases: a fase de sensibilização ou indução e a fase efetora (RANG et al., 2007; BAS et al., 2007).

A oxazolona é um potente agente sensibilizante que produz pouca irritação. A hipersensibilidade induzida em camundongos produz hiperplasia tecidual e aumenta os níveis de leucotrienos e prostaglandinas. A oxazolona é um potente indutor de ciclooxigenase (COX-2), IFN- γ e IL-4 quando aplicada topicamente (WEE et al., 2005), além de induzir uma resposta de hipersensibilidade tardia, quando aplicada repetidamente na orelha dos animais, provocando edema, eritema e abrasão (TAMURA et al., 2004).

Por ser capaz de produzir uma inflamação crônica, dependente de linfócitos T do tipo 1 (Th1) na fase inicial e tipo 2 (Th2) numa fase que se segue à exposição continuada do agente (WEBB et al., 1998), e ser de fácil reprodutibilidade, a DCA induzida por oxazolona têm se mostrado modelo farmacologicamente útil na descoberta de novas drogas para terapia da psoríase (FUJII et al., 2002) e da hipersensibilidade de contato, uma vez que reproduz os aspectos destas doenças humanas induzindo uma elevação nos níveis de IFN- γ e uma pronunciável hiperplasia epidérmica (NICKOLOFF, 1991; BONISH et al., 2000).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As doenças dermatológicas representam aproximadamente 7% das consultas na prática médica. A maioria dos distúrbios da pele possui base inflamatória e alérgica (PETERSEN, 2006). No entanto, existe uma tendência à não-valorização de tais agravos devido a sua baixa letalidade e subestimação da morbidade enquanto problema de saúde. Vários estudos mostram que as doenças dermatológicas têm significativo impacto na qualidade de vida dos atingidos, sobretudo dos cronicamente doentes (BINGEFORS et al., 2002; CHATURVEDI et al., 2005; DALGARD et al., 2004). Existe, portanto, a necessidade de descoberta de novos medicamentos para o tratamento de doenças dermatológicas de maior eficácia e com segurança comprovadas.

A *Physalis angulata* tem sido utilizada na medicina popular em várias condições clínicas incluindo a dermatite. Do gênero *Physalis* já foram isoladas e identificadas várias substâncias biologicamente ativas, incluindo as fisalinas. Várias atividades biológicas das fisalinas já estão descritas na literatura, como atividade antimicrobiana, antitumoral e antileishmanicida (CHIANG et al., 1992a, 1992b; LIN et al., 1992; CHOUDHARY et al., 2005; CHOUDHARY et al., 2007), além da atividade antiinflamatória, atividade imunomodulatória (SOARES et al., 2006) e de inibição da ativação do NF- κ B (VIEIRA et al., 2005; JACOBO-HERRERA et al., 2006; VANDENBERGUE et al., 2008). A atividade antiinflamatória do extrato aquoso da *Physalis angulata* também já foi comprovada, por mecanismos que envolvem a inibição da cicloxigenase, óxido nítrico, proliferação de linfócitos e redução nos níveis de TNF- α (BASTOS et al., 2008).

Apesar de existirem inúmeros trabalhos científicos comprovando as atividades biológicas de várias fisalinas a Fisalina E ainda não foi avaliada em modelos experimentais de dermatite. Portanto, este trabalho de pesquisa visa avaliar o potencial antiinflamatório da Fisalina E, isolada da *Physalis angulata*, em modelos animais de dermatites.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antiinflamatório tópico e oral da Fisalina E, um secoesteroide natural de *Physalis angulata* L., em modelos de dermatite aguda e crônica em camundongos, bem como investigar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antiinflamatória.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar a atividade antiedematogênica da Fisalina E no modelo de dermatite de contato irritativa aguda e crônica induzida por TPA em camundongos.
- ❖ Avaliar a atividade da Fisalina E sobre os níveis teciduais de mieloperoxidase no modelo de dermatite de contato irritativa aguda e crônica induzida por TPA em camundongos.
- ❖ Avaliar os níveis de TNF- α no modelo de dermatite de contato irritativa aguda induzida por TPA em camundongos.
- ❖ Estudar a participação dos receptores esteroidais no mecanismo de ação da Fisalina E na dermatite de contato irritativa aguda induzida por TPA.
- ❖ Fazer a análise histopatológica dos tecidos de orelha submetidos a dermatite de contato aguda e crônica induzido por TPA e análise imunohistoquímica para TNF- α e NF- κ B na dermatite aguda induzida por TPA.
- ❖ Avaliar a atividade antiedematogênica da Fisalina E no modelo de dermatite de contato alérgica crônica induzida por oxazolona em camundongos.
- ❖ Avaliar a atividade da Fisalina E sobre os níveis teciduais de INF- γ no modelo de dermatite de contato alérgica induzida por oxazolona em camundongos.
- ❖ Fazer a análise histopatológica dos tecidos nos modelos de dermatite alérgica induzida por oxazolona em camundongos.

4 MATERIAIS

4.1 Material Botânico

As espécimes da mesma população de *Physalis angulata* foram coletadas na comunidade de Cipó, município de Pentecoste – Ceará em junho de 2003, pelo Prof. Manuel Andrade Neto e autenticada pelo Prof. Edson de Paula Nunes, botânico do Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da UFC, a respectiva coleta encontra-se depositada com o número 34.737. A Fisalina E foi obtida a partir das partes aéreas da *Physalis angulata* no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC pela Profa. Dra. Otilia Deusdênia L. Pessoa e pela doutoranda Maria Leopoldina Veras. Para os experimentos, a Fisalina E foi solubilizada em 2% de Tween 80 em água destilada.

4.2 Animais Experimentais

Camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss Webster, adultos, machos, pesando entre 25 e 30g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central da UFC, foram mantidos em caixas de prolipropileno, à temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos de claro-escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow[®]) e água a vontade. Nos experimentos em que drogas foram administradas por via oral os animais foram colocados em jejum de sólidos por 12 horas. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC (Protocolo n°. 11/08).

4.3 Drogas e Reagentes

PRODUTO	ORIGEM
Ácido clorídrico P.A	Synth
Acetona P.A	Synth
Anticorpo NF- κ B	Sigma
Anticorpo TNF- α	Sigma
Álcool etílico absoluto P.A	Pro Analysis
Azeite de oliva	Galo
Brometo de hexadeciltrimetilamônio-(HTAB)	Sigma
Citrato de sódio	Reagen
Cloreto de sódio P.A	Synth
Cloreto de Potássio P.A	Vetec
Dexametasona	Sigma
EDTA P.A	Sigma
Fosfato de sódio monobásico P.A	Reagen
Fosfato de sódio dibásico P.A	Reagen
Hidrocloreto de σ - dianisidine	Sigma
Mifepristone	Sigma
Nitrogênio líquido	White Martins
Oxazolona	Sigma
13-acetato-12-o-tetradecanoil-forbol (TPA)	Sigma
Peróxido de Hidrogênio P.A	Vetec
Trisma base	Sigma
Tween 80	Sigma
Tween 20	Sigma

4.4 Equipamentos

PRODUTOS

Analisador Bioquímico RA 50

Balança para animais (mod. MF-6)

Balança analítica (mod. AX-200)

Centrífuga refrigerada (0206281)

Leitor de placas (mod. DTX 880)

Micropipetas

Paquímetro Digital (100.174B)

ORIGEM

Bayer

Filizola

Shimadzu

Cientec

Beckman

Biohit

Digimess

5 MÉTODOS

5.1 Obtenção da Fisalina E

As partes aéreas da *Physalis angulata* (4.3 Kg) foram secas a temperatura ambiente, trituradas e submetidas à extração exaustiva com *n*-hexano (2 x 10 L), seguido de extração com EtOH (2 x 10 L), obtendo-se 1,5g e 70,0g de extratos brutos, denominados EHPA E EEPA, respectivamente. O extrato etanólico EEPA (70 g) foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna sobre gel sílica, obtendo-se as seguintes frações: EEPA-H (1,63 g), EEPA-D (9,46 g), EEPA-Dp (2,00 g), EEPA-AE (25,4 g), EEPA-M (29,00 g). A fração EEPA-AE foi fracionada em coluna cromatográfica sobre gel de sílica resultando em seis frações (F1, F2, F3, F4, F5 e F6). A fração F3 (32 g) foi recromatografada em coluna sobre gel sílica. O fracionamento resultou em 10 frações que foram analisadas em CCD. Na eluição $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (4:6) foi obtido um material sólido branco, que após recristalização em acetona forneceu 1,2 g de um material cristalino com P.F 302-305°, denominado Fisalina E (**Figura 8 e 9**)

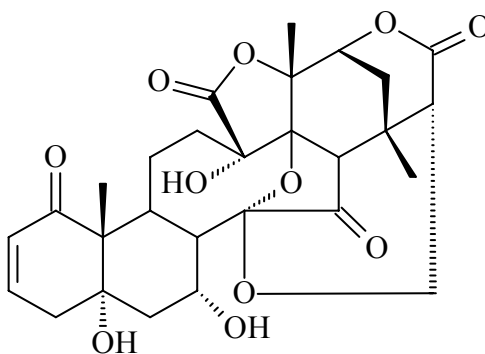


Figura 8 - Estrutura Química da Fisalina E

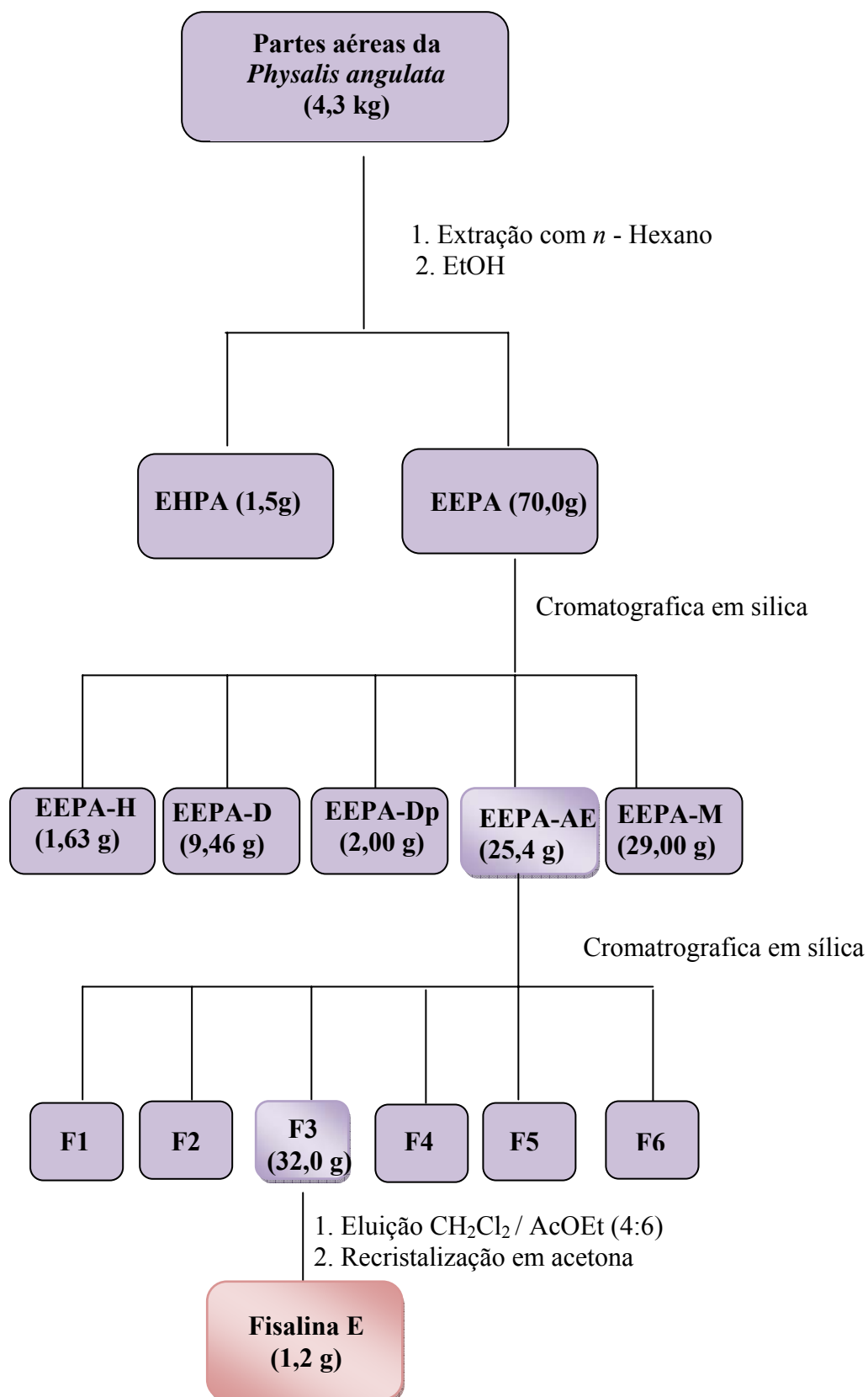


Figura 9 - Método de obtenção da Fisalina E

5.2 Dermatite de contato irritativa aguda induzida por TPA

A dermatite de contato irritativa foi induzida de acordo com o método descrito por Recio et al. (2000) com uma aplicação tópica de 10 µl de uma solução de TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) em acetona (2,5µl/orelha) na orelha esquerda de camundongos, machos, pesando entre 25-30g e divididos em grupos de oito animais. A Fisalina E foi aplicada topicamente nas doses de 0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha, num volume de 10 µl/orelha, simultaneamente ao TPA, ou por via oral nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, num volume de 10ml/kg, 45 min antes da aplicação do TPA. O controle positivo foi a dexametasona, administrada por via tópica (0,5mg/orelha) ou por via oral (1 mg/kg). Animais tratados com o veículo (2% de Tween 80 em água destilada), por via tópica ou oral, foram incluídos no estudo. A espessura da orelha, que quantifica o edema, foi registrada antes e quatro horas após a administração do TPA fazendo uso de um paquímetro digital (100.174B/ Digimess®). Após o registro do edema, os animais foram sacrificados e amostras de tecidos das orelhas (5 mm) foram coletadas para a determinação da mieloperoxidase e do TNF- α , assim como para a realização do estudo histopatológico.

Na investigação da participação dos receptores esteroidais, camundongos, machos, pesando entre 25-30g e divididos em grupos de oito animais foram tratados com veículo, Fisalina E (0,5 mg/orelha, por via tópica; 30 mg/kg por v.o) ou dexametasona (0,05 mg/orelha por via tópica; 1mg/kg por v.o). O antagonista de receptor esteroide, mifepristone, 25 mg/kg, foi administrado por via subcutânea, 15 min antes dos tratamentos. A dermatite foi induzida pela aplicação tópica de 10 µl de uma solução de TPA em acetona (2,5µl/orelha) na orelha esquerda dos animais. Após o registro do edema, na quarta hora após a aplicação do TPA, os animais foram sacrificados e amostras de tecidos das orelhas (5mm) coletadas para a determinação da mieloperoxidase e do TNF- α , assim como para a realização do estudo histopatológico e imunohistoquímico (TNF- α e NF- κ B).

5.3 Dermatite de contato irritativa induzida pelo uso crônico de TPA

A dermatite de contato irritativa crônica foi induzida segundo o procedimento descrito por Stanley et al. (1991). Cerca de 20 µl de uma solução de TPA (2,5µg/orelha) foi aplicada topicamente em dias alternados durante 10 dias, em ambas as superfícies da orelha esquerda de camundongos, machos, pesando entre 25-30g e divididos em grupos de oito animais. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada), Fisalina E por via tópica (0.125; 0.25 e 0.5 mg/orelha) ou via oral (3, 10 e 30 mg/kg) ou dexametasona (0,05 mg/orelha, via tópica ou 1mg/kg, via oral) foram administrados uma vez ao dia, durante 10 dias, imediatamente após a aplicação do TPA. A espessura da orelha, que quantifica o edema, foi registrada 4h após a aplicação de TPA, fazendo uso de um paquímetro digital (100.174B/ DIGIMESS[®]). No último dia de tratamento, dia 10, os camundongos foram sacrificados, 6 h após o tratamento com o TPA, e amostras de tecidos das orelhas (5mm) coletadas para a determinação da mieloperoxidase, assim como para a realização do estudo histopatológico.

5.4 Determinação da atividade de Mieloperoxidase

Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do corpo por serem recrutados rapidamente ao local da inflamação através da quimiotaxia (ABBAS et al., 2002). O aumento significativo da atividade da mieloperoxidase (MPO) tem uma proporção direta ao número de neutrófilos infiltrados no tecido, portanto pode se utilizar sua atividade como índice de migração leucocitária e de estresse oxidativo (SIMPSON et al., 1988; KOMATSU et al., 1992; PERALTA et al., 1993).

As amostras de orelhas (5mm) foram coletadas 6 horas após a administração do TPA e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após o congelamento, as amostras foram homogeneizadas em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50mM pH 6.0 (1 ml por 50mg do tecido). O homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento, 5 minutos (-70° C) e descongelamento (15 segundos no sonicador, 37°C). As amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm numa temperatura de 4° C por 15 minutos. A MPO contida no sobrenadante (0,1ml) foi analisada espectrofotometricamente após a adição de 2,9ml de tampão fosfato (50mM, pH 6) contendo 0,167mg/ml de hidrocloreto de *o*-

dianisidine e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudança na absorbância a 470nm foram medidas no tempo 0 e 5 minutos (BRADLEY et al.,1982).

5.5 Determinação dos níveis teciduais de TNF- α

A administração de anticorpos anti-TNF tem mostrado papel importante nas dermatites de contato alérgica e irritativa (PIGUET et al., 1991, PIGUET et al., 1987).

As amostras de orelhas (5mm) coletadas 6 horas após a administração do TPA agudo ou crônico foram imediatamente homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) com 1mM de EDTA, o homogenato foi então incubado no gelo por 15 minutos. Os homogenatos foram centrifugados a 10,000 x g por 10 minutos (MURAKAWA et al., 2006). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram separados e os níveis de TNF- α determinados utilizando-se um kit de Elisa para TNF- α de camundongos (R;D, MTA00, Minneapolis, MN, USA). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e os níveis de TNF- α descritos em pg/ml.

5.6 Análise imunohistoquímica de TNF- α e NF- κ B

A imunohistoquímica para o TNF- α e Fator Nuclear- κ B (NF- κ B) foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Quatro horas após a aplicação do TPA, os animais foram sacrificados e uma amostra de 5 mm da orelha esquerda foi retirada e fixada em formol 10% por 24 h para confecção de lâminas apropriadas para imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6), sob aquecimento em forno de microondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (15 minutos). Os cortes foram incubados *overnight* (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-TNF α diluído 1:200 ou anti-NF κ B diluído 1:50 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA). Após a lavagem no dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído 1:200 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain[®], Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 30 minutos. Após nova lavagem

com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas.

5.7 Dermatite de contato alérgica induzida por Oxazolona

A indução da dermatite por oxazolona foi realizada de acordo com o método descrito por Young e Young (2000). Camundongos, machos, pesando entre 25-30g, divididos em grupos de oito animais, foram sensibilizados, por dois dias consecutivos, com aplicação tópica de 50µl de oxazolona 2% em etanol absoluto no abdômen anteriormente tricotomizado. Após 6 dias da sensibilização, um total de 20µl de oxazolona 1% em uma mistura de acetona e azeite de oliva (4:1) foi aplicada nos dois lados da orelha esquerda dos animais, sendo este considerado o primeiro dia de tratamento (1º. dia). O procedimento foi repetido a cada 72 horas durante 19 dias. A Fisalina E foi administrada por via tópica nas doses de 0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha, num volume de 20 µl, na orelha esquerda dos animais, 30 minutos antes e 3 horas após cada aplicação de oxazolona ou administrada por via oral nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, 45 minutos antes da oxazolona. A dexametasona foi utilizada como controle positivo nas doses de 0,05 mg/orelha, por via tópica e 1 mg/Kg por via oral. A espessura das orelhas, que quantifica a hiperplasia da epiderme, foi registrada 72 horas após cada aplicação de oxazolona, usando para isso um paquímetro digital (100.174B/ DIGIMESS®). No último dia de tratamento, 19º dia, 6 horas após a última aplicação de oxazolona, os animais foram sacrificados e amostras de tecidos das orelhas (5mm) foram retiradas e processadas para determinação do INF- γ , assim como para a realização do estudo histopatológico.

5.8 Determinação dos níveis teciduais de INF- γ

O IFN- γ é crucial para o desenvolvimento da hiperplasia da pele em modelos animais de dermatite (SPERGEL et al., 1999).

As amostras de orelhas (5mm), coletadas seis horas após a última administração da oxazolona, foram imediatamente homogeneizadas em 1 ml de uma solução de PBS com tween 20 a 0,1%. O homogenato foi então, por duas vezes, congelado a -30°C por 30 minutos e em seguida descongelado no banho-maria a 37°C por 15 minutos. Em seguida as amostras foram

individualmente submetidas a 15 segundos no sonicador. Os homogenatos foram centrifugados durante 5 minutos a 13,000xg, o sobrenadante retirado e estocado a -30°C até o momento de determinar a citocina (KITAGAKI et al., 1997). Para quantificar os níveis teciduais de INF- γ , usou-se um kit de Elisa de INF- γ para camundongos (R & D, MTA00, Minneapolis, MN, USA). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e os níveis de INF- γ descritos em pg/ml.

5.9 Avaliação Histopatológica

Para verificação das alterações teciduais microscópicas da orelha foram realizados cortes histológicos de todos os grupos tratados no modelo de dermatite de contato aguda induzida por TPA e dermatite de contato alérgica induzida por oxazolona. O tecido foi fixado em formaldeído tamponado 10% e incluído em parafina. Os cortes foram obtidos através de micrótomo 4 μ m, corados em lâminas com hematoxilina-eosina e examinados a microscopia ótica. A análise histopatológica foi realizada pela Profa. Dra. Gerly Anne Castro de Brito do Departamento de Morfologia da UFC.

Dentre os parâmetros utilizados para a determinação do dano tecidual, incluiu-se a infiltração de células mono e polimorfonucleadas, o edema, a hiperplasia epidérmica e a destruição tecidual (LEE et al., 2009).

5.10 Análise Estatística

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Para comparação múltipla dos parâmetros foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), e o nível de significância entre os grupos foi determinada pelo teste de Student Newman Keul. Em todas as análises, considerou-se estatisticamente significante um valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Obtenção da Fisalina E

A obtenção da Fisalina E a partir das partes aéreas da *Physalis angulata* teve um rendimento de aproximadamente 0,027%.

6.2 Atividade da Fisalina E na dermatite de contato irritativa aguda induzida por TPA em camundongos

6.2.1 Edema de orelha induzido por TPA

A **Figura 10** demonstra o efeito antiedematogênico da administração tópica da Fisalina E no edema de orelha induzido por TPA em camundongos. A Fisalina E nas doses 0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha, via tópica, reduziu, de forma significativa ($p < 0,001$), o edema de $0,2820 \pm 0,007$ mm (veículo) para $0,1889 \pm 0,006$ mm; $0,1730 \pm 0,008$ mm e $0,1724 \pm 0,002$ mm respectivamente, representando uma redução de 33,1; 38,7 e 39%. A dexametasona (0,05mg/orelha), um antiinflamatório esteroide, utilizado como controle positivo, reduziu significantemente ($p < 0,001$) o edema induzido pelo TPA de $0,2820 \pm 0,007$ mm (veículo) para $0,1628 \pm 0,002$ mm (redução de 42,3%).

A Fisalina E, por via oral, nas doses 3, 10 e 30 mg/kg reduziu, de forma significativa ($p < 0,05$), o edema de $0,2900 \pm 0,0023$ mm (veículo) para $0,1890 \pm 0,0015$ mm; $0,1720 \pm 0,001$ mm e $0,15530 \pm 0,001$ mm, respectivamente, correspondendo a uma redução de 34,8; 40,7 e 47,3 % (**Figura 11**). A dexametasona, controle positivo, reduziu o edema induzido por TPA de $0,290 \pm 0,0023$ mm (veículo) para $0,1556 \pm 0,001$ mm (redução de 46,6 %) (**Figura 11**).

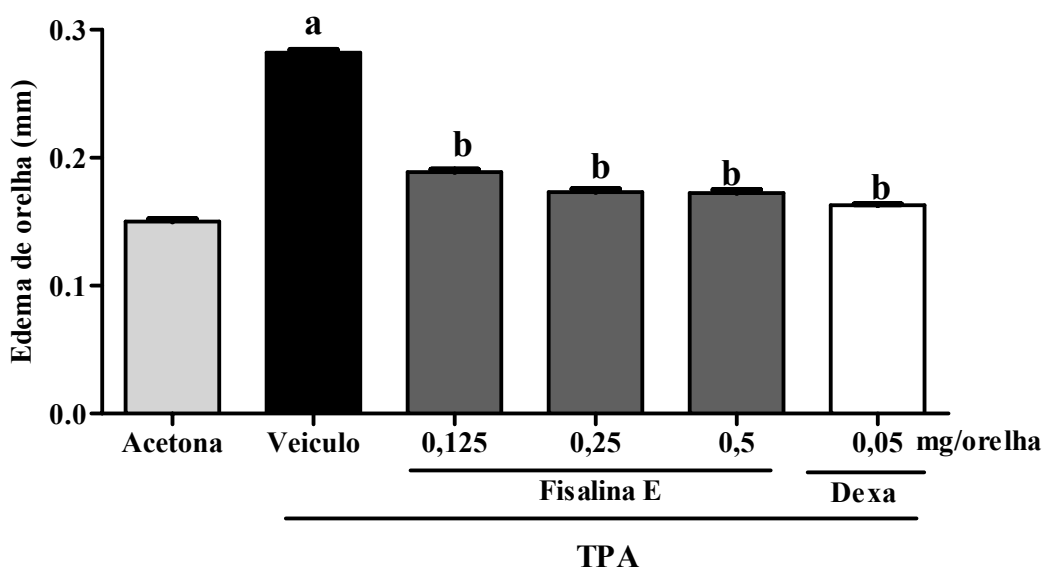


Figura 10 – Efeito da Fisolina E, administrada por via tópica, no edema de orelha agudo induzido por TPA em camundongos

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, 10 μ l/orelha), Fisolina E (0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram administrados simultaneamente a aplicação tópica do TPA (2,5 μ g/10 μ l/orelha) na superfície da orelha esquerda. Os valores representam a média \pm E.P.M do edema de orelha (mm) registrado 4h após aplicação do TPA. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs acetona; ^b $p < 0,05$ vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

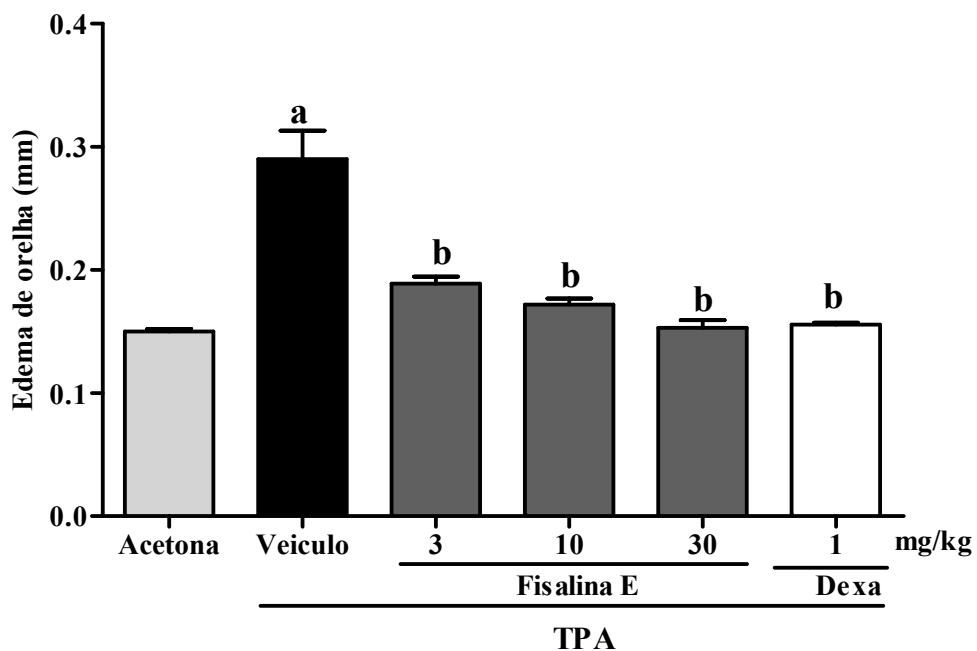


Figura 11 - Efeito da Fisalina E administrada, por via oral, no edema de orelha agudo induzido por TPA em camundongos

Nota: Veículo (2% de Tween 80, via oral), Fisalina E (3,10 e 30 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg,) foram administrados por via oral 45 min antes da aplicação tópica do TPA (2,5 μ g/ 10 μ l/ orelha) na superfície da orelha esquerda. Os valores representam a média \pm E.P.M do edema de orelha (mm). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^ap < 0,05 vs acetona; ^bp < 0,05 vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.2.2 Participação dos receptores esteroidais na atividade antiedematogênica da Fisalina E

As **Figuras 12 e 13** mostram o efeito do pré-tratamento com o antagonista de receptores esteroidais, mifepristone, sobre a atividade antiedematogênica oral e tópica da Fisalina E na dermatite aguda induzida por TPA.

O pré-tratamento com mifepristone (25 mg/kg, s.c.) foi capaz de inibir de forma significativa ($p < 0,001$) a atividade antiedematogênica tópica da Fisalina E (0,5 mg/orelha) de um valor de 0,1613 mm para 0,1950 mm. O pré-tratamento com mifepristone também reduziu significativamente ($p < 0,001$) o efeito antiedematogênico da dexametasona (0,05 mg/orelha) de 0,1663 mm para 0,1950 mm (**Figura 12**).

O pré-tratamento com mifepristone (25 mg/kg, s.c.) foi capaz de reverter o efeito antiedematogênico oral da Fisalina E (30 mg/kg) de 0,1730mm para 0,2562 mm e da dexametasona (1mg/kg) de 0,1650 mm para 0,2670 mm (**Figura 13**).

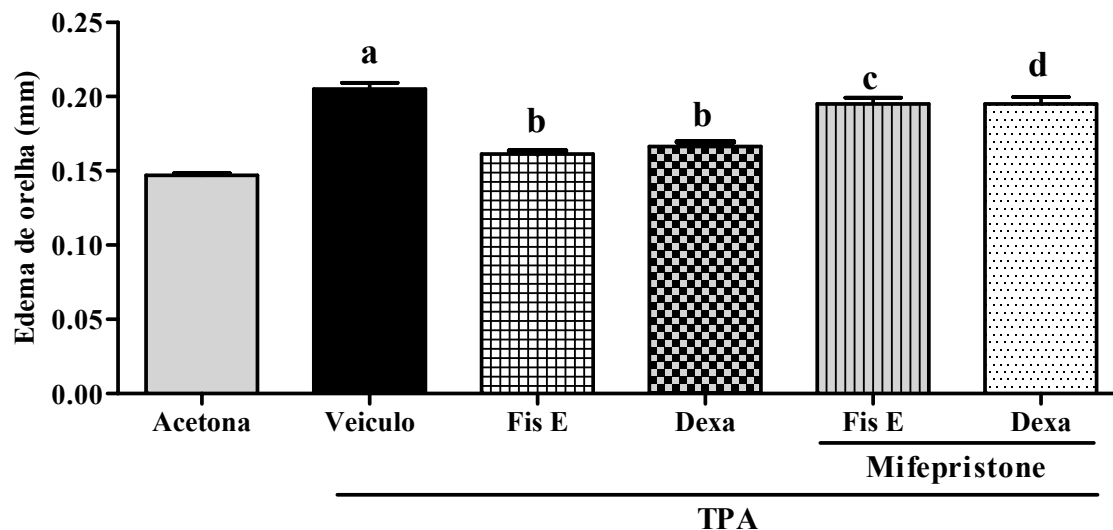


Figura 12 - Participação dos receptores esteroidais no mecanismo antiedematogênico tópico da Faisalina E

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, 10µl/orelha), Faisalina E (0,5 mg/orelha) e dexametasona (0,05mg/orelha) foram administrados simultaneamente a aplicação tópica do TPA (2,5µg/10µl/orelha) na superfície da orelha esquerda. O antagonista esteroidal, mifepristone, na dose de 25 mg/kg, foi administrado 15 minutos antes da administração de Faisalina E e dexametasona. Os valores representam a média ± E.P.M do edema de orelha (mm) registrado 4h após aplicação do TPA. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^ap<0,05 vs acetona; ^bp<0,05 vs veículo; ^cp<0,05 vs Faisalina E e ^dp<0,05 vs dexametasona (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

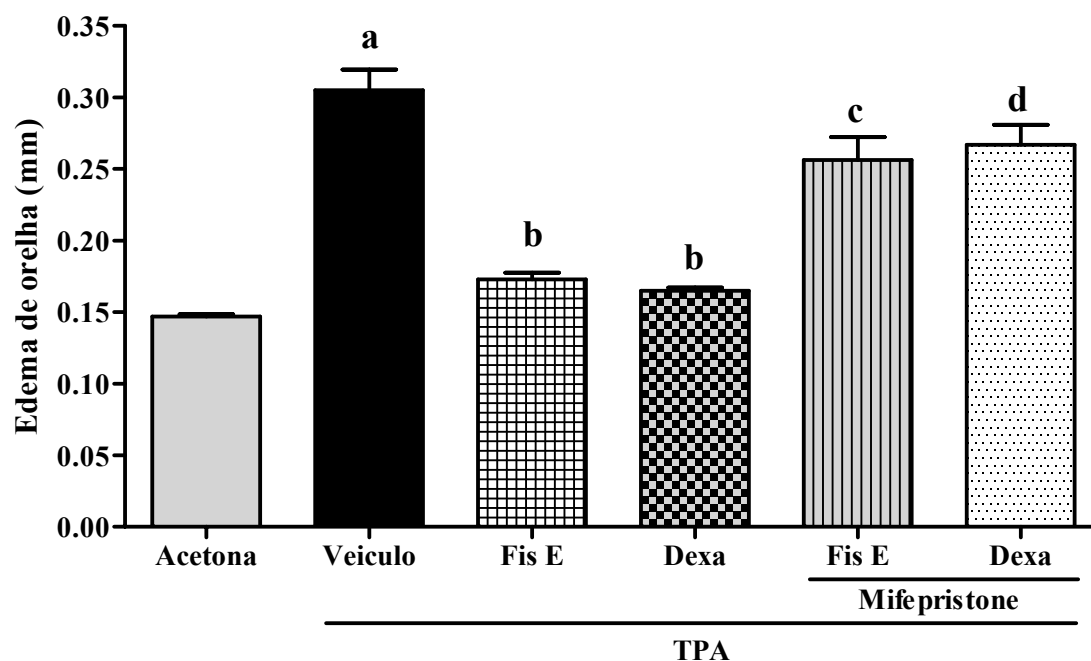


Figura 13 - Participação dos receptores esteroidais no mecanismo antiedematogênico oral da Fisolina E

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, via oral), Fisolina E (30 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg) foram administrados por via oral 45 min antes da aplicação tópica do TPA (2,5 µg/10 µl/orelha) na superfície da orelha esquerda. O antagonista esteroidal mifepristone, na dose de 25 mg/kg, foi administrado 15 minutos antes da administração de Fisolina E e Dexametasona. Os valores representam a média ± E.P.M do edema de orelha (mm) registrado 4h após aplicação do TPA. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,05 vs acetona; ^b p<0,05 vs veículo; ^c p<0,05 vs Fisolina E e ^d p<0,05 vs dexametasona (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.2.3 Atividade de Mieloperoxidase

A **Figura 14** mostra o efeito da administração tópica da Fisalina E sobre a mieloperoxidase, medida através da absorbância (470 nm), induzida pela aplicação tópica aguda de TPA em camundongos. A Fisalina E nas doses 0,125; 0,25 e 0,5mg/orelha, reduziu, de forma significativa ($p < 0,05$) a mieloperoxidase de $0,2357 \pm 0,001$ absorbância (veículo) para $0,1288 \pm 0,001$; $0,1121 \pm 0,001$ e $0,0765 \pm 0,002$ absorbância, correspondendo a 45,7; 52,5 e 67,6% de inibição, respectivamente, já a dexametasona reduziu, significativamente ($p < 0,001$), a mieloperoxidase de $0,2357 \pm 0,001$ absorbância (veículo) para $0,0397 \pm 0,004$ absorbância (83,4 % de inibição).

A administração de mifepristone (25mg/kg, s.c.) foi capaz de reverter o efeito tópico da Fisalina E (0,25 mg/orelha) assim como da dexametasona (0,05 mg/orelha) (**Figura 15**).

A **Figura 16** mostra o efeito da administração oral da Fisalina E sobre a mieloperoxidase, medida através da absorbância (470 nm), induzida pela aplicação tópica aguda de TPA em camundongos. A Fisalina E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a mieloperoxidase de $0,3656 \pm 0,009$ absorbância (veículo) para $0,2220 \pm 0,008$; $0,1956 \pm 0,009$ e $0,1670 \pm 0,001$ absorbância, correspondendo a uma inibição de 39,3; 46,7 e 54,3%, respectivamente. A dexametasona, administrada oralmente, reduziu a mieloperoxidase para $0,1814 \pm 0,002$ absorbância, o que representa uma redução de 81,7%.

A administração de mifepristone (25mg/kg, s.c.) foi capaz de reverter o efeito oral da Fisalina E (30 mg/kg) assim como da dexametasona (1 mg/kg) (**Figura 17**).

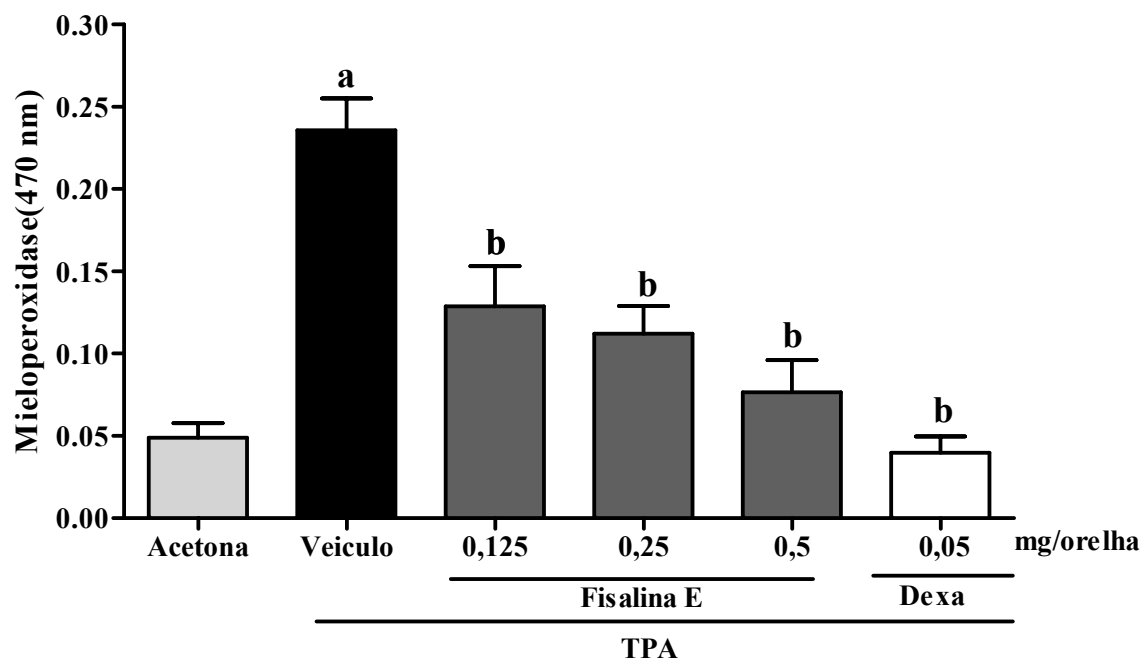


Figura 14 - Efeito da Fisalina E, administrada por via tópica, na atividade de mieloperoxidase na dermatite aguda induzida por TPA camundongos

Nota: Veículo (2% de Tween 80, via tópica, 10 μ l/orelha), Fisalina E (0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha, via tópica) e dexametasona (0,05mg/orelha, via tópica) foram administrados simultaneamente a aplicação tópica do TPA (2,5 μ g/ 10 μ l/ orelha) na superfície da orelha esquerda. Os valores representam a média \pm E.P.M dos níveis teciduais de mieloperoxidase (absorbância 470 nm). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p< 0,05 vs acetona; ^b p< 0,05 vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

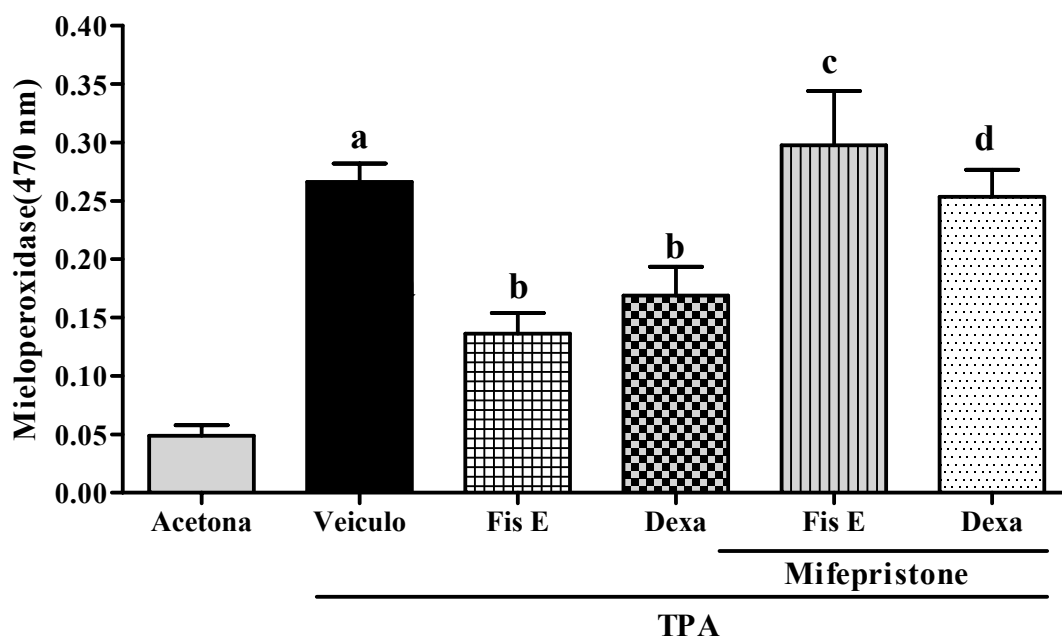


Figura 15 - Participação dos receptores esteroidais no mecanismo de ação tópico da Fisalina E, sobre a atividade da mieloperoxidase, na dermatite de contato aguda induzida por TPA

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, 10 μ l/orelha), Fisalina E (0,5 mg/orelha) e dexametasona (0,05mg/orelha) foram administrados simultaneamente a aplicação tópica do TPA (2,5 μ g/10 μ l/orelha) na superfície da orelha esquerda. O antagonista esteroidal, mifepristone, na dose de 25 mg/kg, foi administrado 15 minutos antes da administração de Fisalina E e Dexametasona. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,05 vs acetona; ^b p<0,05 vs veiculo; ^c p<0,05 vs Fisalina E e ^d p<0,05 vs dexametasona (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

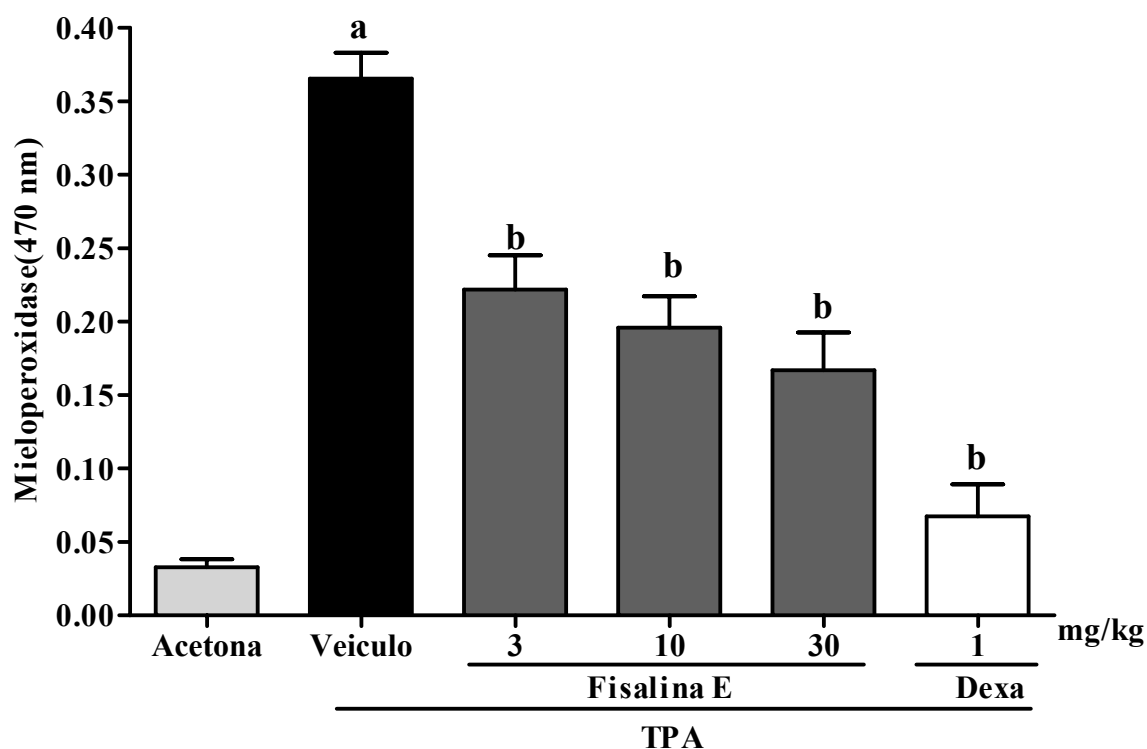


Figura 16 - Efeito da Fisalina E, administrada por via oral, na atividade de mieloperoxidase na dermatite aguda induzida por TPA camundongos

Nota: Veículo (2% de Tween 80), Fisalina E (3,10 e 30 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg, v) foram administrados por via oral 45 min antes da aplicação tópica do TPA (2,5µg/ 10µl/ orelha) na superfície da orelha esquerda. Os valores representam a média ± E.P.M dos níveis de mieloperoxidase (470 nm). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^ap< 0,05 vs acetona; ^bp< 0,05 vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul)

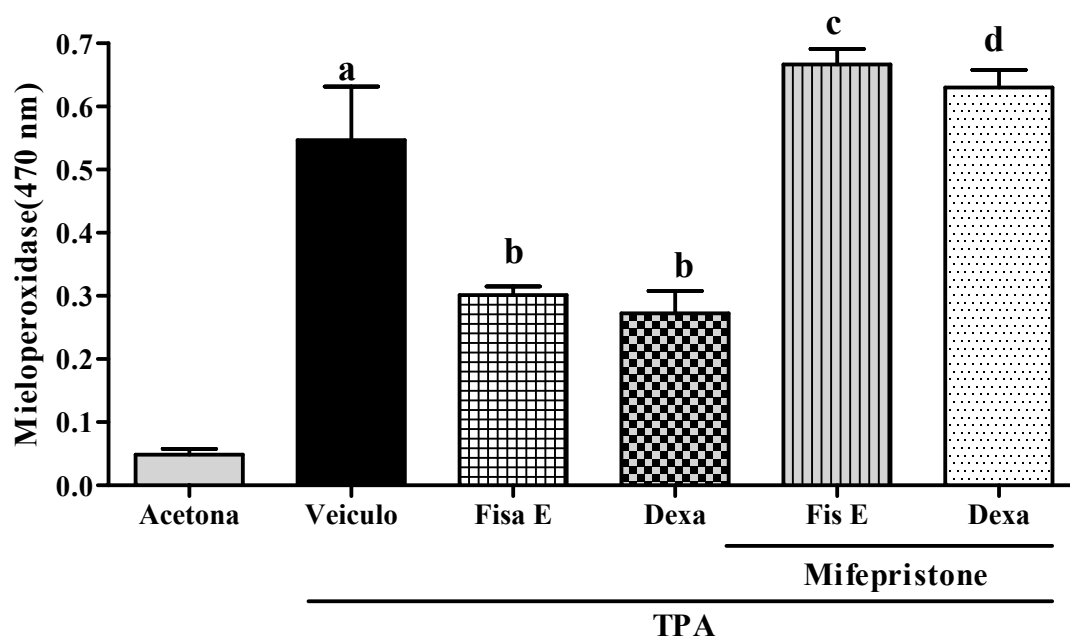


Figura 17 - Participação dos receptores esteroidais no mecanismo de ação oral da Fimalina E, sobre a atividade da mieloperoxidase, na dermatite de contato aguda induzida por TPA

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada), Fimalina E (30 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg) foram administrados por via oral 45 min antes da aplicação tópica do TPA (2,5µg/10µl/orelha) na superfície da orelha esquerda. O antagonista esteroidal, mifepristone, na dose de 25 mg/kg, foi administrado 15 minutos antes da administração de Fimalina E e Dexametasona.. Foram utilizados 8 animais por grupo.^a p<0,05 vs acetona; ^b p<0,05 vs veículo; ^c p<0,05 vs Fimalina E e ^d p<0,05 vs dexametasona (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.2.4 Níveis teciduais de TNF- α

As **Figuras 18 e 19** mostram o efeito da Fisalina E, por via tópica e oral, respectivamente, sobre os níveis teciduais de TNF- α induzidos pela aplicação tópica de TPA. Por via tópica, a FIS E (0.5 mg/orelha) reduziu os níveis de TNF- α em 57,2% e a DEXA (0.05 mg/orelha) em 65,6% em relação ao controle veículo (**Figura 18**). O pré-tratamento com antagonista mifepristone (25 mg/kg, s.c.) reverteu significativamente ($p < 0.001$) a redução dos níveis de TNF- α pela Fisalina E (0,5 mg/orelha) de $6,5 \pm 0,84$ pg/ml para $12,09 \pm 1,259$ pg/ml e da dexametasona (0,05 mg/orelha) de $5,225 \pm 0,5806$ pg/ml para $12,73 \pm 1,22$ pg/ml (**Figura 18**).

A Fisalina E, por via oral na dose de 30 mg/kg, diminuiu os níveis teciduais de TNF- α em 73,7%. A dexametasona, usada como controle positivo na dose de 1mg/kg, foi capaz de reduzir em 79,2% os níveis teciduais de TNF- α . (**Figura 19**). O pré-tratamento com mifepristone reverteu significativamente o efeito de redução dos níveis de TNF- α da fisalina E, por via oral na dose de 30 mg/kg, de $6,35 \pm 0,6434$ pg/ml para $13,53 \pm 1,393$ pg/ml, enquanto que a dexametasona a redução foi de $5,025 \pm 0,5937$ pg/ml para $20,44 \pm 2,946$ pg/ml. (**Figura 19**).

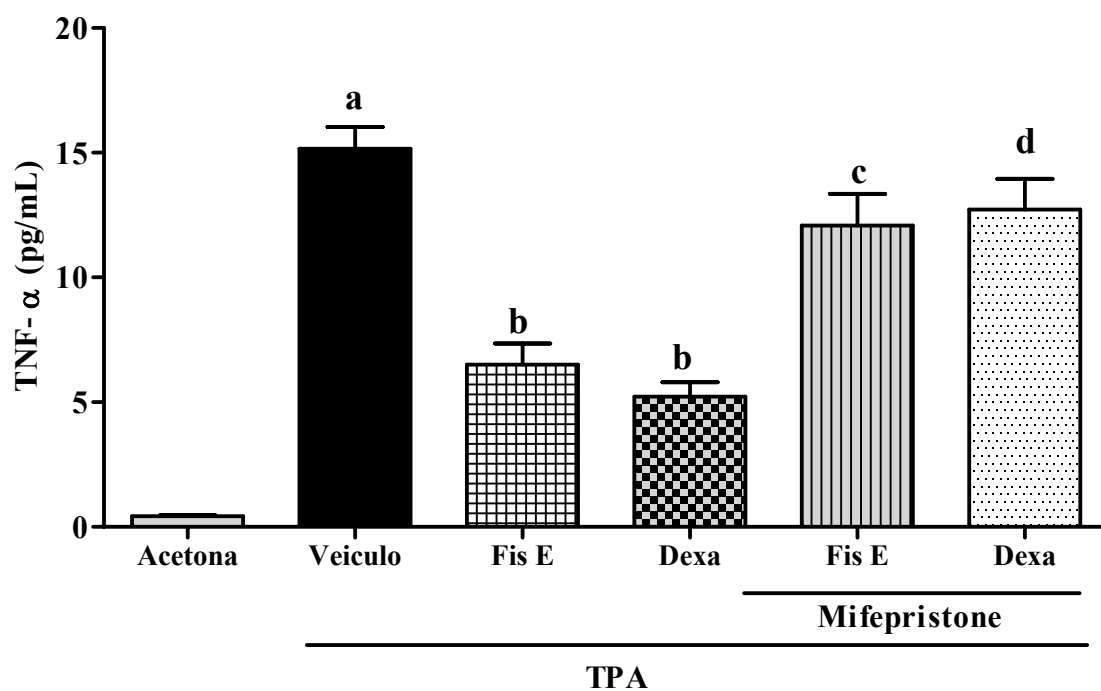


Figura 18 - Efeito da Fisalina E, administrada topicamente, nos níveis teciduais de TNF- α na dermatite de contato aguda induzida por TPA

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, 10 μ l/orelha), Fisalina E (0,5 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) foram administrados simultaneamente a aplicação tópica do TPA (2,5 μ g/10 μ l/orelha) na superfície da orelha esquerda. O antagonista esteroidal, mifepristone (25 mg/kg, s.c.) foi administrado 15 minutos antes da administração de Fisalina E e Dexametasona. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,05 vs acetona; ^b p<0,05 vs veículo; ^c p<0,05 vs Fisalina E e ^d p<0,05 vs dexametasona (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

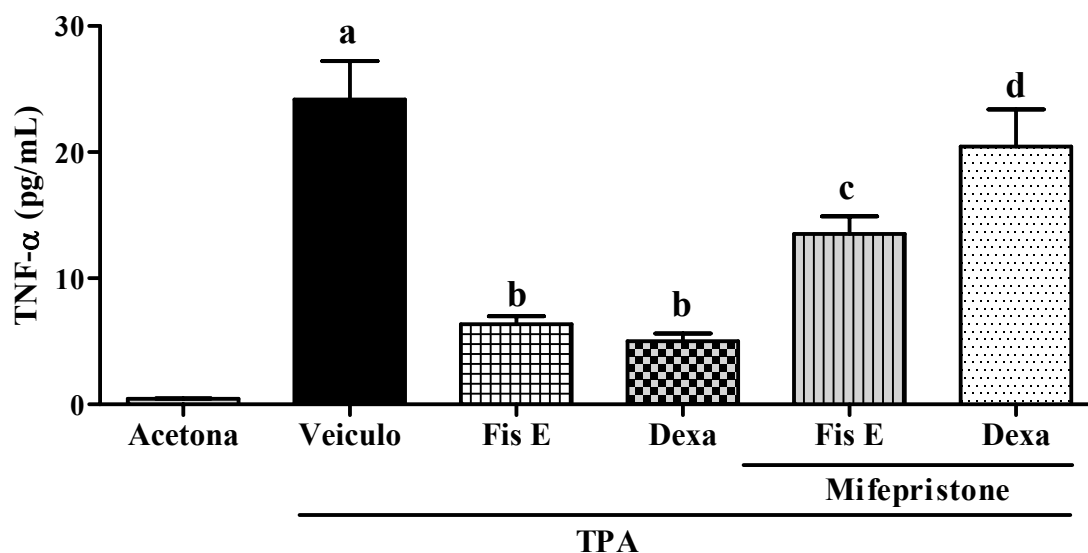


Figura 19 - Efeito da Fisalina E, administrada oralmente, nos níveis de TNF- α na dermatite de contato aguda induzida por TPA

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada), Fisalina E (30 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg) foram administrados pro via oral 45 min antes da aplicação tópica do TPA (2,5 μ g/10 μ l/orelha) na superfície da orelha esquerda. O antagonista esteroideal, mifepristone, na dose de 25 mg/kg, foi administrado 15 minutos antes da administração de Fisalina E e Dexametasona. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,05 vs acetona; ^b p<0,05 vs veiculo; ^c p<0,05 vs Fisalina E e ^d p<0,05 vs dexametasona (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.2.5 Análise Histológica

A administração aguda de TPA (2,5µg/orelha) induziu um edema intenso e infiltrado de células inflamatórias com presença de células mononucleares e polimorfonucleares (**Figura 20B**). O tratamento tópico com Fisalina E (0,5 mg/orelha) ou dexametasona (0,05 mg/orelha) diminuiu o edema da derme e a infiltração de células inflamatórias (**Figura 20 C e D**). A administração do antagonista de receptor esteroidal, mifepristone, reverteu os efeitos antiinflamatórios da Fisalina E e da Dexametasona observados na análise histopatológica (**Figura 20E e F**).

O tratamento oral com Fisalina E (30 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg) diminuiu o edema da derme e a infiltração de células inflamatórias induzido por TPA (2,5µg/orelha) (**Figura 21B, C e D**). A administração do antagonista de receptor esteroidal, mifepristone, reverteu os efeitos antiinflamatórios da Fisalina E e da Dexametasona observados na análise histopatológica (**Figura 21E e F**).

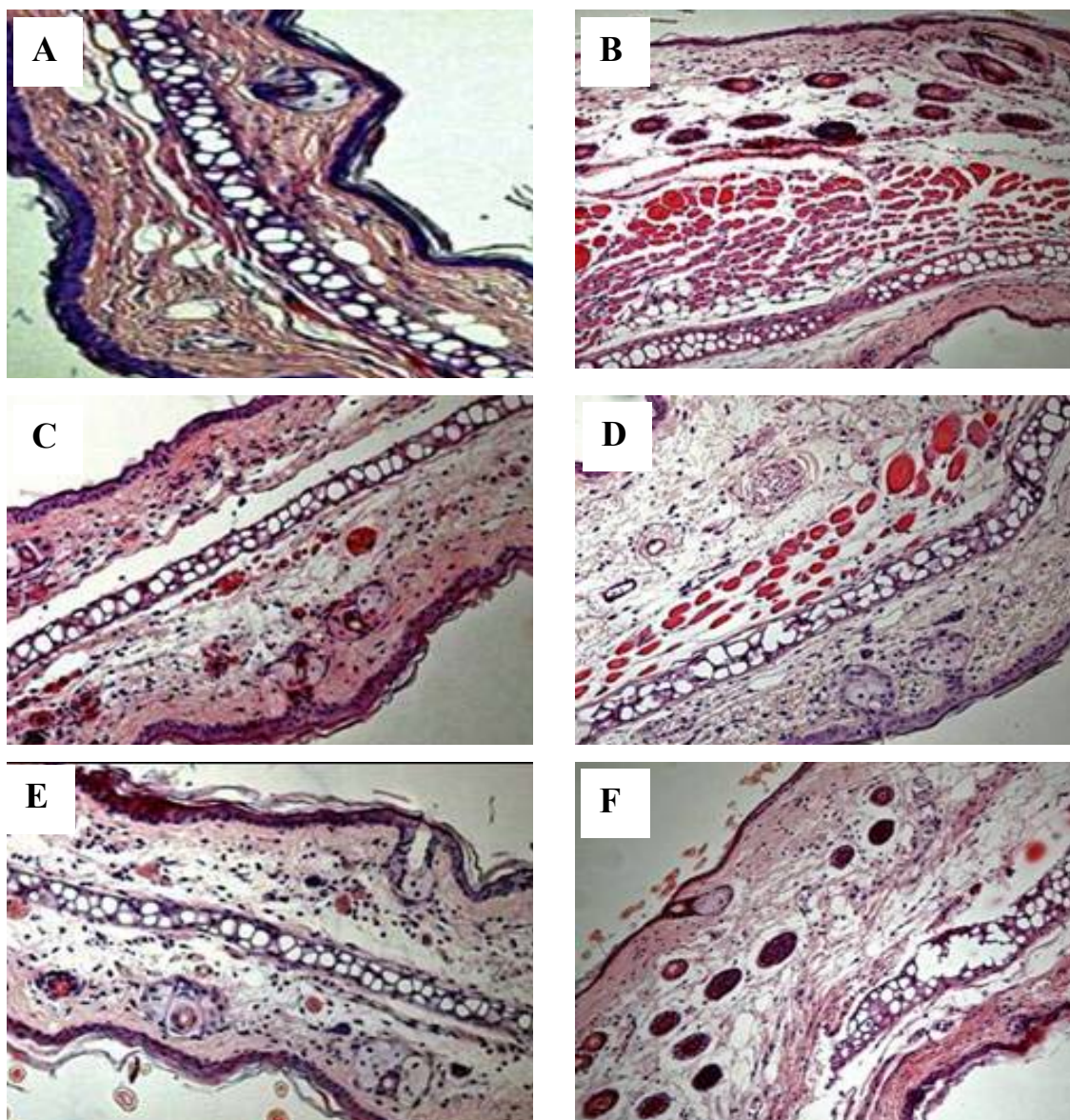


Figura 20 – Análise histológica de orelhas de camundongos tratados topicamente com Fisalina E e Dexametasona na dermatite de contato aguda induzida por TPA: Papel dos receptores esteroidais. A: controle normal; B: TPA (2,5 μ g/orelha); C: Fisalina E (0,5 mg/orelha) + TPA; D: Mifepristone (25 mg/kg, s.c.) + Fisalina E + TPA; E: Dexametasona (0.05mg/ orelha) + TPA; F: Mifepristone + Dexametasona + TPA. Hematoxilina e eosina. x 100.

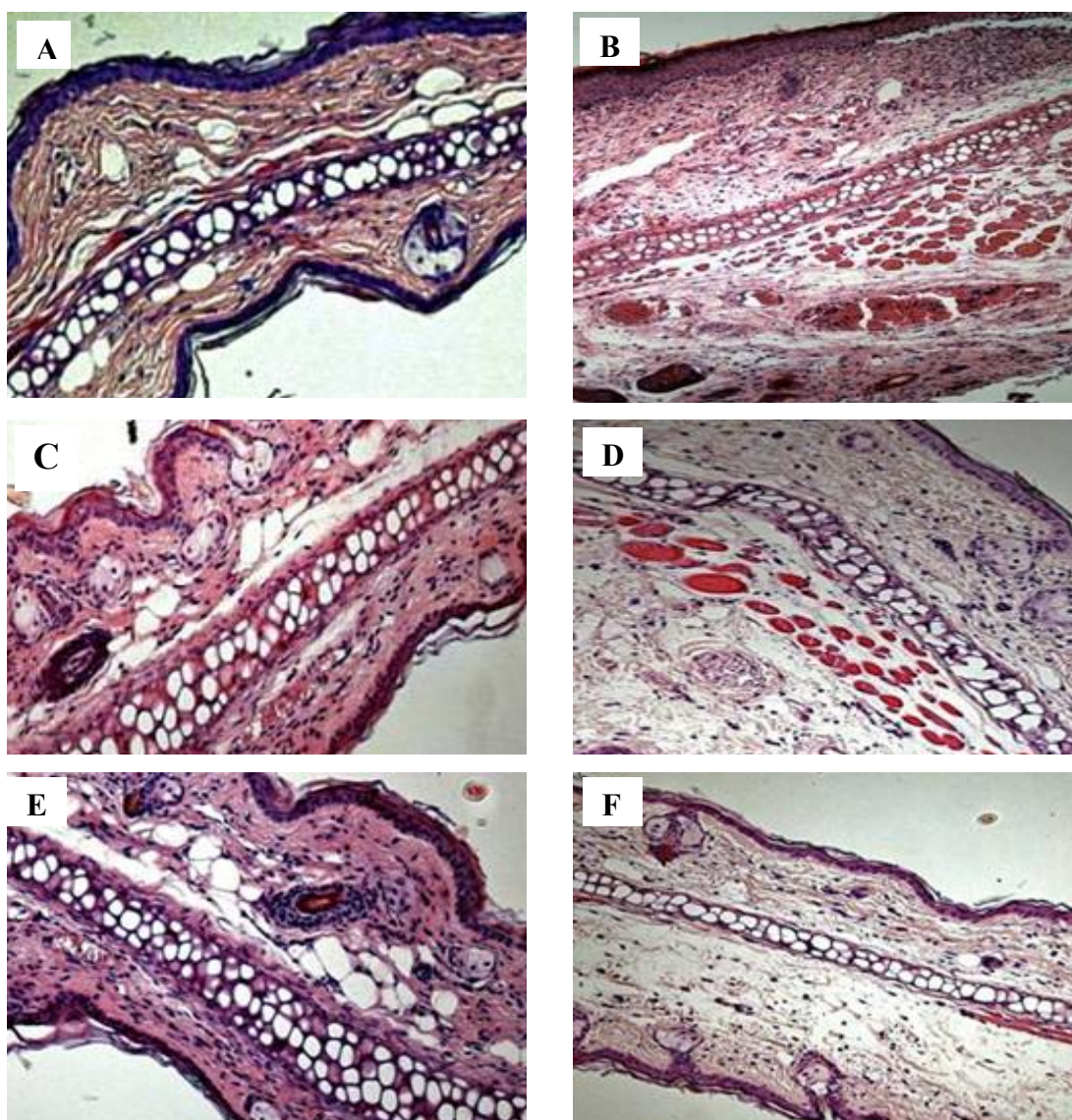


Figura 21 – Análise histológica de orelhas de camundongos tratados oralmente com Fisolina E e Dexametasona na dermatite de contato aguda induzida por TPA: Papel dos receptores esteroidais. A: controle normal; B: TPA (2,5µg/orelha); C: Fisolina E (30 mg/kg) + TPA; D: Mifepristone (25mg/kg, s.c.) + Fisolina E + TPA; E: Dexametasona (1 mg/kg) + TPA; F: Mifepristone + Dexametasona + TPA. Hematoxilina e eosina. x 100.

6.3 Atividade da Fisalina E no modelo de dermatite crônica induzida por TPA

6.3.1 Edema de orelha induzido por TPA

As **Figuras 22 e 23** mostram o efeito antiedematogênico da administração tópica e oral da Fisalina E no edema de orelha crônico induzido por TPA em camundongos. A Fisalina E nas doses 0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha, reduziu, de forma significativa ($p < 0,05$), o edema de $0,2729 \pm 0,003$ mm (veículo) para $0,2210 \pm 0,002$ mm; $0,2100 \pm 0,002$ mm e $0,1900 \pm 0,001$ mm (correspondendo a uma inibição de 19, 23 e 30.3%), respectivamente. A dexametasona, antiinflamatório esteroidal utilizado como controle positivo, reduziu o edema induzido por TPA de $0,290 \pm 0,0023$ mm (veículo) para $0,1840 \pm 0,001$ mm (32,6 %) (**Figura 22**).

A Fisalina E, por via oral, nas doses 3,10 e 30 mg/kg, reduziu, de forma significativa ($p < 0,05$), o edema de $0,2363 \pm 0,001$ mm (veículo) para $0,2175 \pm 0,001$ mm; $0,2013 \pm 0,002$ mm e $0,1963 \pm 0,001$ mm (correspondendo a uma inibição de 8; 14,8 e 17%), respectivamente. A dexametasona (1 mg/kg, v.o), reduziu de forma significativa, o edema de $0,2363 \pm 0,001$ mm (veículo) para $0,1875 \pm 0,002$ mm (20,65 %) (**Figura 23**).

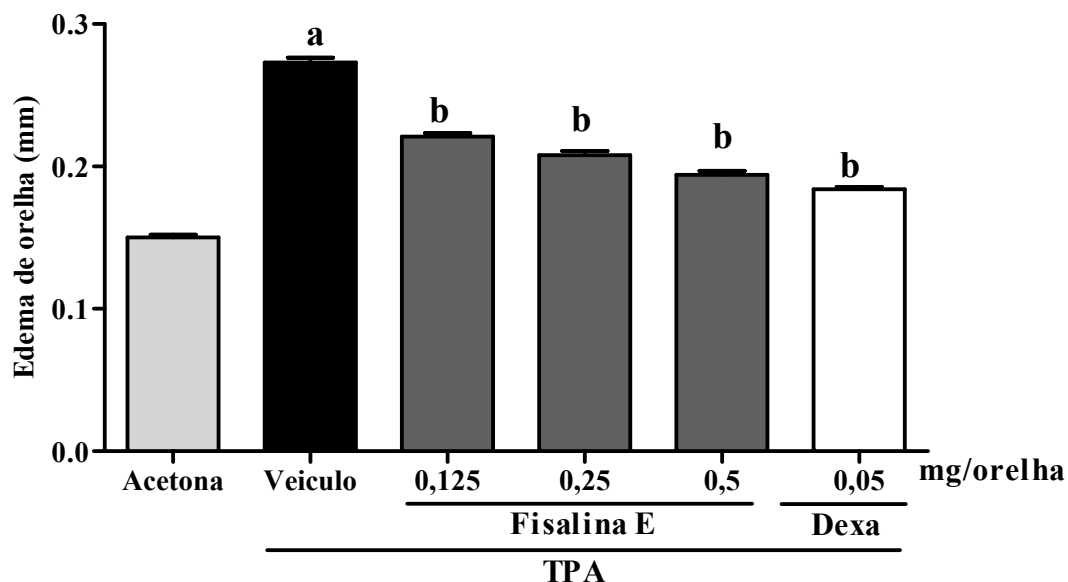


Figura 22 – Efeito da Fisolina E, administrada por via tópica, no edema de orelha crônico induzido por TPA em camundongos

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, 10 μ l/orelha), Fisolina E (0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha) e dexametasona (0,05mg/orelha) foram administrados em dias alternados durante dez dias de tratamento na superfície da orelha esquerda simultaneamente a aplicação tópica de TPA (2,5 μ g/10 μ l/orelha). Os valores representam a média \pm E.P.M do edema de orelha (mm) registrado 6h após a aplicação do TPA no último dia de tratamento. Foram utilizados 8 animais por grupo.^a $p < 0,05$ vs acetona; ^b $p < 0,05$ vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

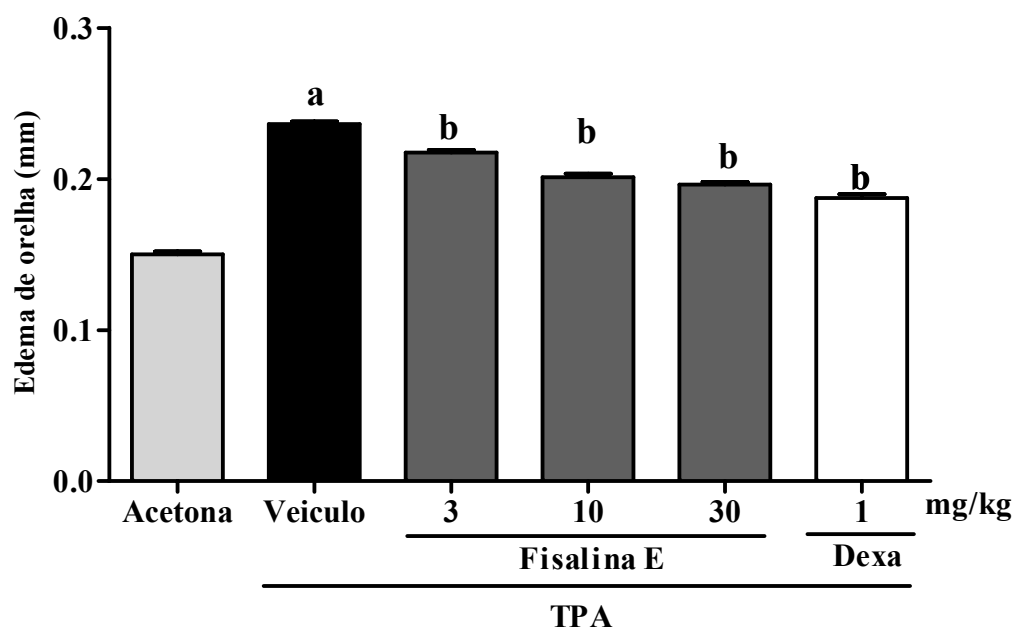


Figura 23 – Efeito da Fisalina E, administrada por via oral, no edema de orelha crônico induzido por TPA em camundongos

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada), Fisalina E (3,10 e 30 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg) foram administrados por via oral em dias alternados durante os dez dias na superfície da orelha esquerda 45 min antes da aplicação tópica do TPA(2,5µl/10µl/orelha). Os valores representam a média ± E.P.M do edema de orelha (mm) registrado após 6h da aplicação do TPA no último dia de tratamento. Foram utilizados 8animais por grupo. ^a p< 0,05 vs acetona; ^b p< 0,05 vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.3.2 Atividade de Mieloperoxidase

As **Figuras 24 e 25** mostram o efeito antiinflamatório da administração tópica e oral da Fisalina E, através da diminuição da densidade óptica da mieloperoxidase, induzida pela aplicação tópica de TPA em camundongos. A Fisalina E nas doses de 0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha, reduziu a atividade de mieloperoxidase de $0,4833 \pm 0,002$ (veículo) para $0,3420 \pm 0,003$; $0,2960 \pm 0,003$ e $0,2380 \pm 0,005$ (30; 38,8 e 50,8%), respectivamente. A dexametasona, administrada topicamente, reduziu a atividade da MPO para $0,2100 \pm 0,003$, o que representa uma redução de 56,6% quando comparada ao controle veículo. (**Figura 24**).

Por via oral a Fisalina E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg reduziu, de maneira significativa, a densidade óptica da mieloperoxidase de $0,4917 \pm 0,003$ (veículo) para $0,2800 \pm 0,003$; $0,2238 \pm 0,002$ e $0,2000 \pm 0,001$ (43,1; 54,5 e 59,3%), respectivamente. A DEXA administrada oralmente na dose de 1 mg/kg, reduziu, significativamente, a MPO para $0,1717 \pm 0,002$, o que representa uma redução de 65 % quando comparada ao controle veículo (**Figura 25**).

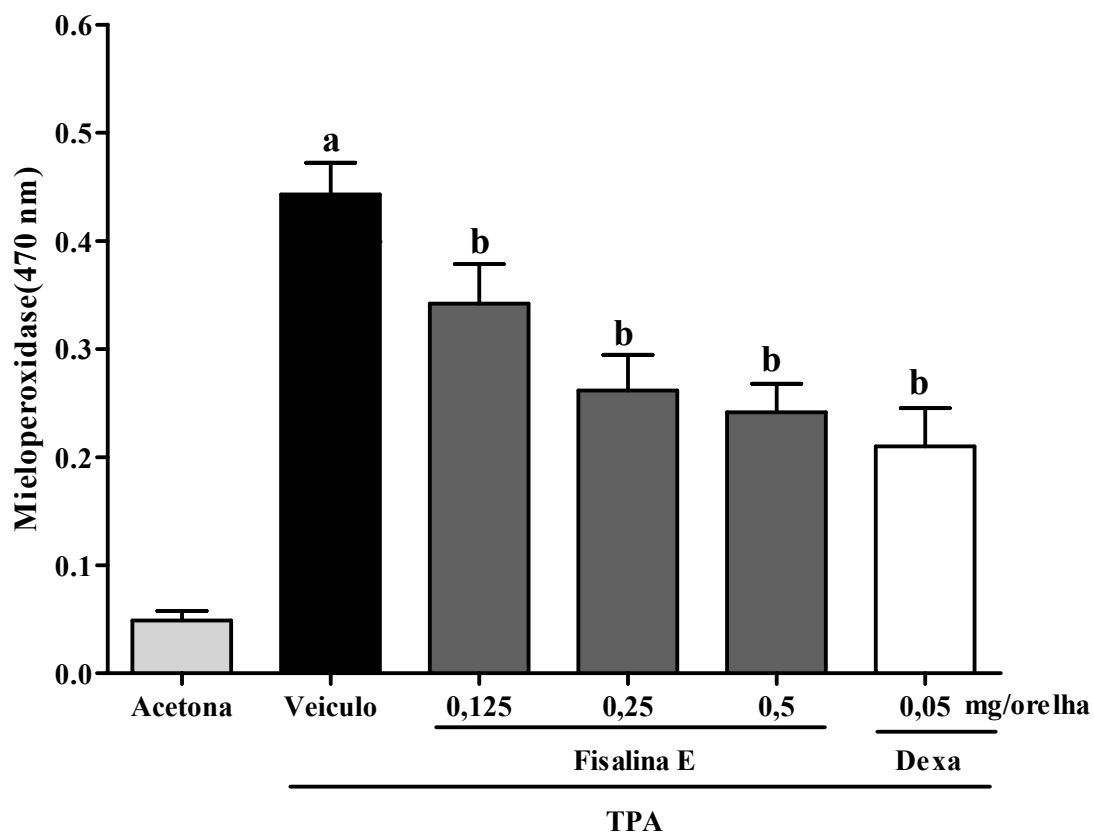


Figura 24 - Efeito da Fisalina E, administrada por via tópica, na atividade da mieloperoxidase na dermatite crônica induzida por TPA em camundongos

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, 10µl/orelha), Fisalina E (0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha) e dexametasona (0,05mg/orelha). Os valores representam a média ± E.P.M dos níveis de mieloperoxidase (absorbância 470nm) no último dia de tratamento crônico. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p< 0,05 vs acetona; ^b p< 0,05 vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

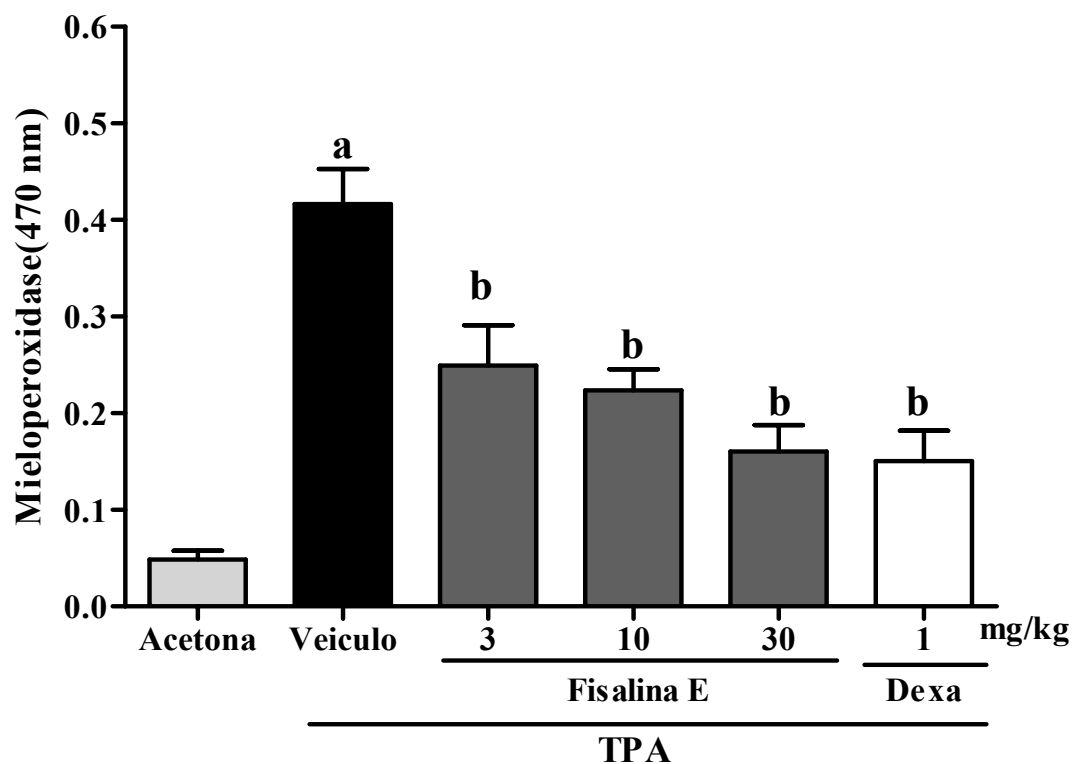


Figura 25 - Efeito da Fisolina E, administrada por via oral, na atividade da mieloperoxidase na dermatite crônica induzida por TPA em camundongos

Nota: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada), Fisolina E (3,10 e 30 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg). Os valores representam a média \pm E.P.M dos níveis de mieloperoxidase (densidade óptica) no último dia de tratamento crônico. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs acetona; ^b $p < 0,05$ vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul)

6.4 Análise Imunohistoquímica

6.4.1 Efeito da Fisalina E e do Antagonista Mifepristone na marcação imunohistoquímica para TNF α

A marcação imunohistoquímica foi acentuada para a citocina TNF- α nas células do tecido conjuntivo da orelha de camundongos submetido dermatite de contato aguda induzida por TPA (Figura 26B), em relação à marcação observada na orelha de um animal normal (Figura 26A). O tratamento com Fisalina E (0,5 mg/orelha, por via tópica; Figura 26C) ou com Dexametasona (0,05 mg/orelha, via tópica; Figura 26E), reduziu, consideravelmente, a marcação imunohistoquímica para TNF- α .

O pré-tratamento com Mifepristone (25 mg/kg,s.c) reverteu o efeito da Fisalina E (Figura 26D) assim como da dexametasona (Figura 26E) sobre a marcação imunohistoquímica para o TNF- α .

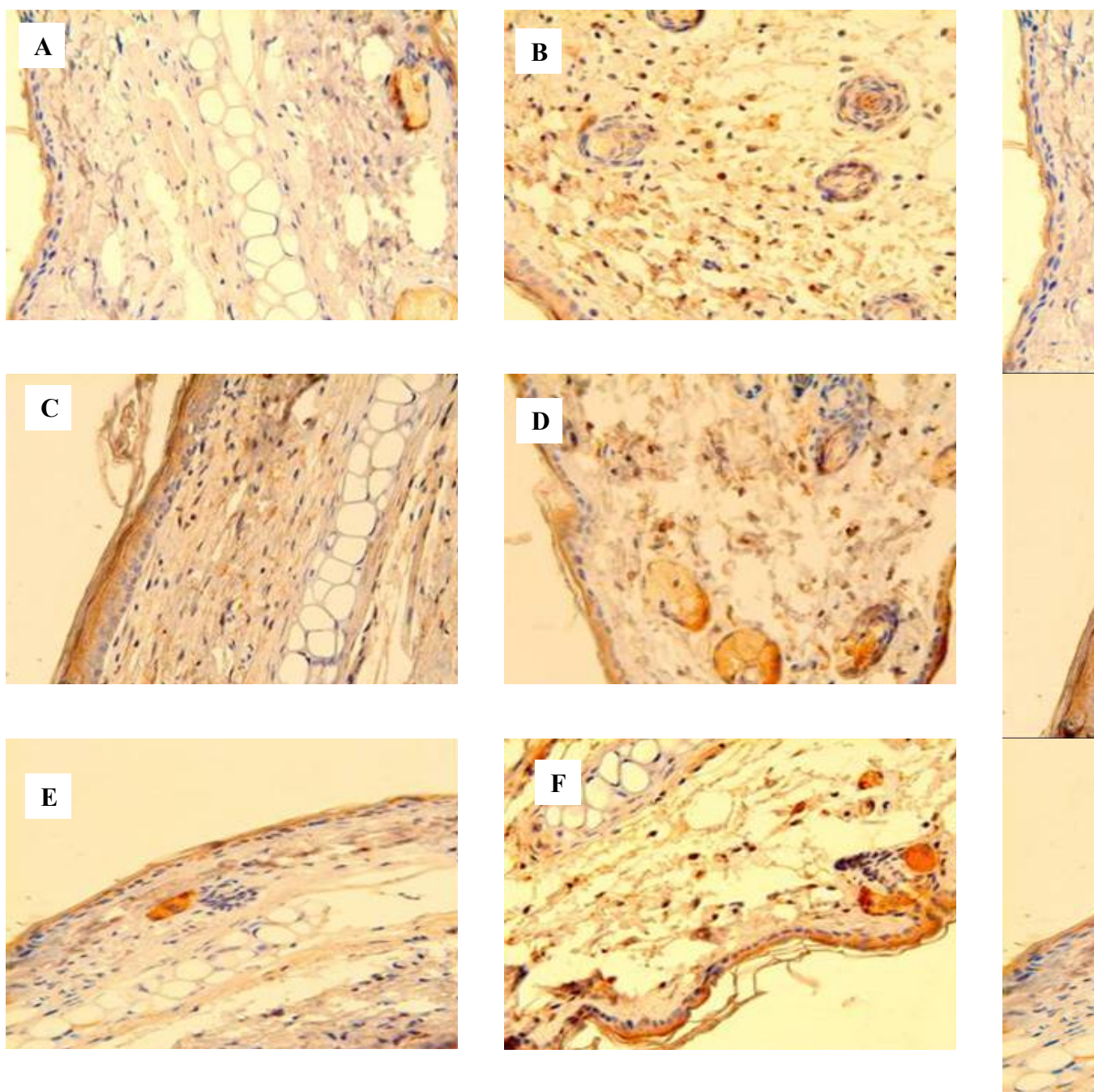


Figura 26 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF- α da orelha de camundongos tratados com Fisalina E, por via tópic, na dermatite de contato irritativa aguda por TPA: Participação dos receptores esteroidais. Controle normal (A); TPA (2,5 μ g/orelha) (B); Fisalina E (0,5 mg/orelha) + TPA (C); Mifepristone (25 mg/kg, s.c) + Fisalina E (D); Dexametasona (0,05 mg/orelha) (E); Mifepristone + Dexametasona (F). x 100.

6.4.2 Efeito da Fisalina E e do Antagonista Mifepristone na marcação imunohistoquímica para NF- κ B

A marcação imunohistoquímica foi acentuada para a citocina NF- κ B nas células do tecido conjuntivo da orelha de camundongos submetido dermatite de contato aguda induzida por TPA (Figura 27B), em relação à marcação observada na orelha de um animal normal (Figura 27A). O tratamento com Fisalina E (0,5 mg/orelha, por via tópica; Figura 27C) ou com Dexametasona (0,05 mg/orelha, via tópica; Figura 26E), reduziu, consideravelmente, a marcação imunohistoquímica para NF- κ B.

O pré-tratamento com Mifepristone (25 mg/kg,s.c) reverteu o efeito da Fisalina E (Figura 27D) assim como da dexametasona (Figura 27E) sobre a marcação imunohistoquímica para o NF- κ B.

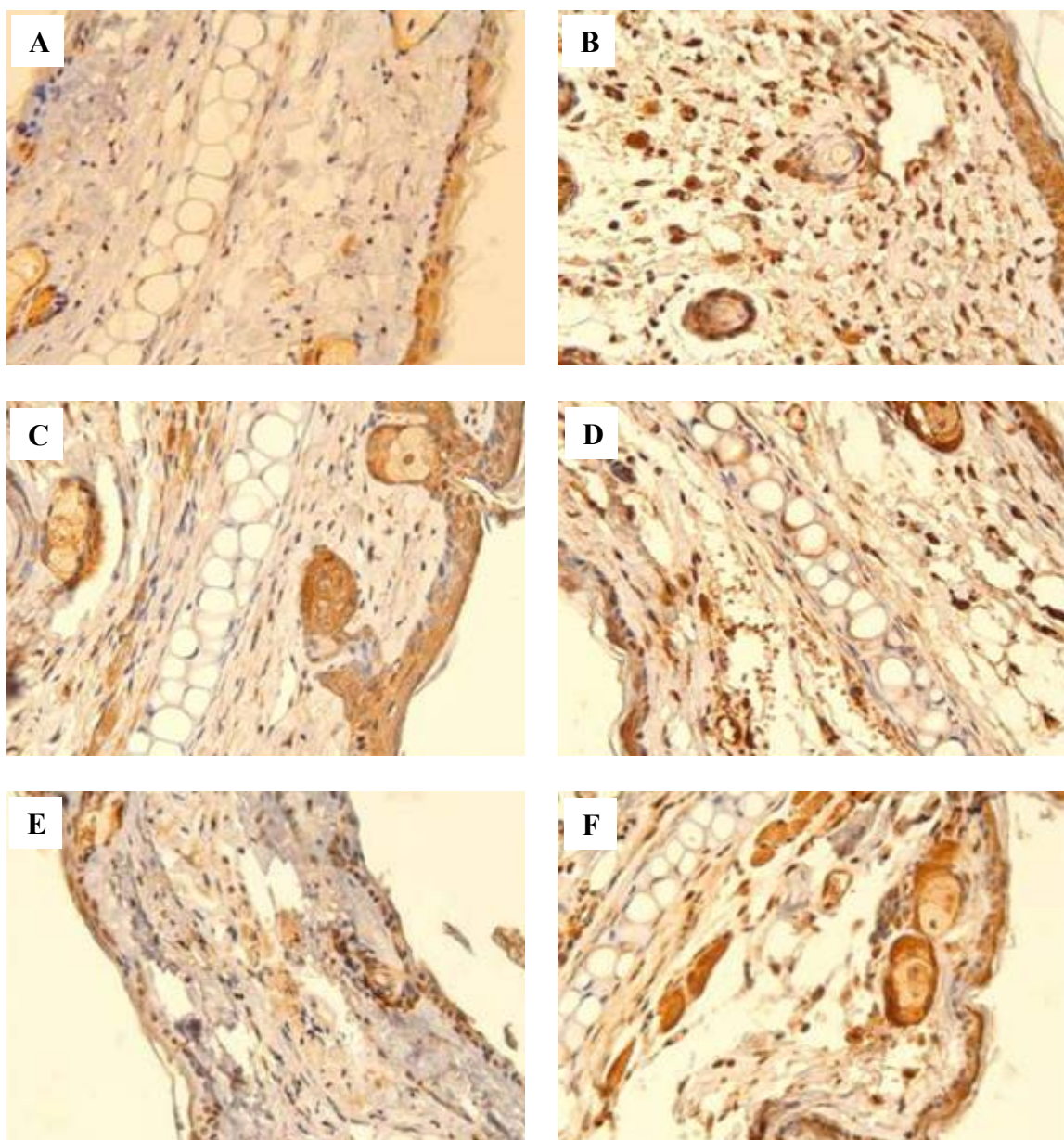


Figura 27 - Fotomicrografias de imunohistoquímica para NF- κ B da orelha de camundongos tratados com Fisalina E, por via tópica, na dermatite de contato irritativa aguda por TPA: Participação dos receptores esteroidais. Controle normal (A); TPA (2,5 μ g/orelha) (B); Fisalina E (0,5 mg/orelha) + TPA (C); Mifepristone (25 mg/kg, s.c) + Fisalina (D); Dexametasona (0,05 mg/orelha) (E); Mifepristone + Dexametasona (F). x 100

6.5 Atividade da Fisalina E no modelo de dermatite de contato alérgica induzida por oxazolona

6.5.1 Hiperplasia epidérmica induzida por oxazolona

As **Figuras 28 e 29** mostram o efeito da Fisalina E administrada topicamente e oralmente na hiperplasia epidérmica induzida por oxazolona em camundongos através da variação da espessura da pele da orelha dos animais.

A Fisalina E nas doses 0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha (via tópica) e nas doses de 3,10 e 30 mg/kg (via oral) reduziu, de forma significativa, a hiperplasia epidérmica da orelha induzida por oxazolona (1%/orelha) em todos os períodos de observação (7^o-19^o dia). A dexametasona, por via tópica (0,05 mg/orelha) e oral (1 mg/kg), reduziu significativamente, a hiperplasia epidérmica induzida por oxazolona do 7^o ao 19^o dia de observação (**Figura 28 e 29**).

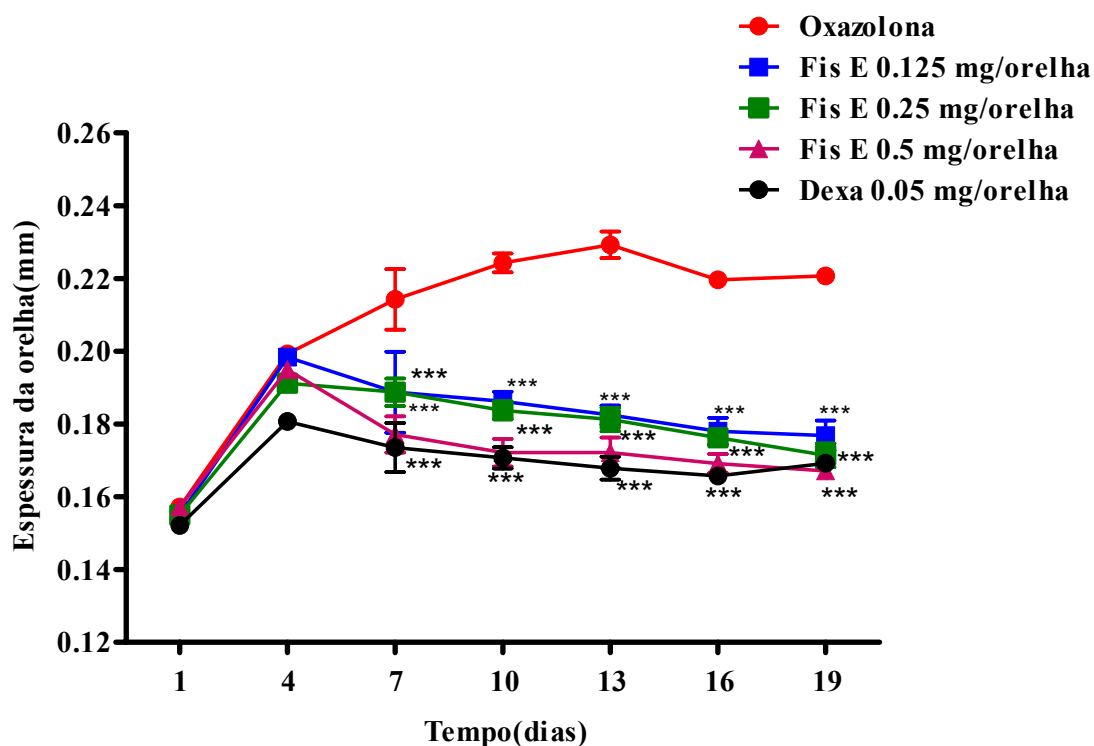


Figura 28 - Efeito da Fisalina E, administrada por via tópica, sobre a hiperplasia epidérmica induzida por oxazolona em camundongos

Nota: Fisalina E foi aplicada por via tópica, nas doses 0,125; 0,25 e 0,5 mg/orelha e a dexametasona na dose de 0,05mg/orelha. Seis dias após a sensibilização, a oxazolona foi aplicada nos dois lados da orelha esquerda dos animais a cada três dias. A Fisalina E e a dexametasona foram aplicados topicamente na orelha 30 min antes e três horas depois de cada aplicação de oxazolona. Os valores representam a média \pm E.P.M da espessura da orelha (mm). Foram utilizados 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle oxazolona.

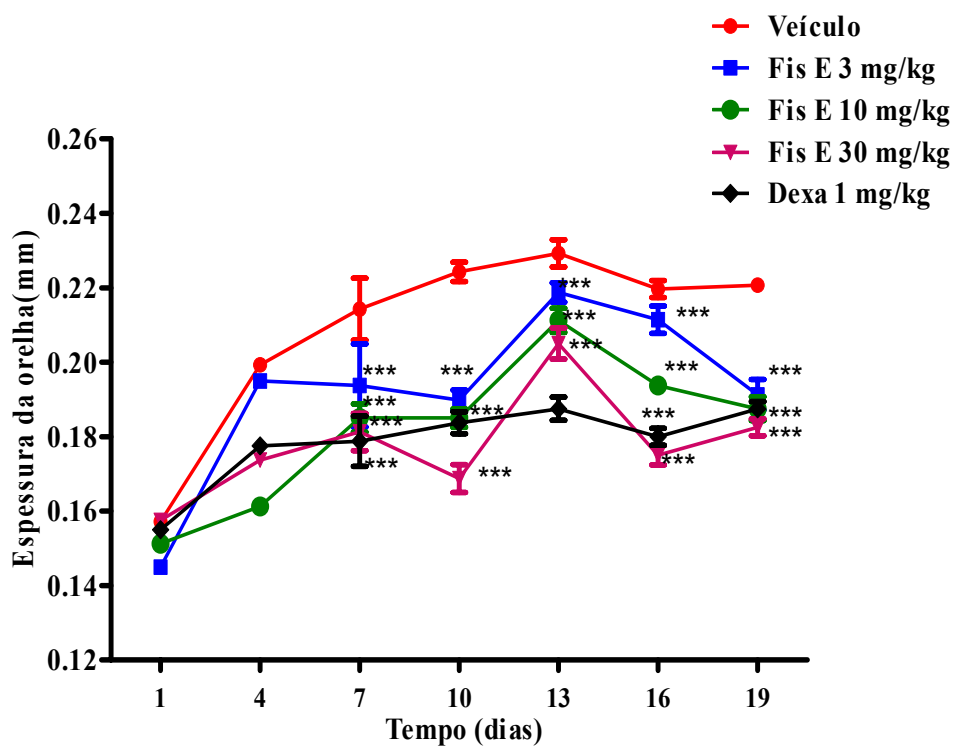


Figura 29 - Efeito da Fisalina E, administrada por via oral, sobre a hiperplasia epidérmica induzida por oxazolona em camundongos

Nota: A Fisalina E, administrado via oral, nas doses 3,10 e 30 mg/kg e a dexametasona na dose 1mg/kg. Seis dias após a sensibilização, a oxazolona foi aplicada nos dois lados da orelha esquerda dos animais a cada três dias. A Fisalina E e a dexametasona foram administrados oralmente 45 min antes de cada aplicação de oxazolona. Os valores representam a média \pm E.P.M da espessura da orelha (mm). Foram utilizados 8 animais por grupo.***p< 0,001 vs controle oxazolona.

6.5.2 Níveis teciduais de INF- γ

A **Figura 30** mostra o efeito da administração tópica de Fialina E e da Dexametasona sobre os níveis teciduais de IFN- γ na dermatite alérgica induzida por oxazolona em camundongos.

A Fialina E (0,5 mg/orelha) diminuiu os níveis de IFN- γ em 43,5%. A dexametasona (0,05 mg/orelha) foi capaz de diminuir os níveis teciduais de IFN- γ em 37,47%.

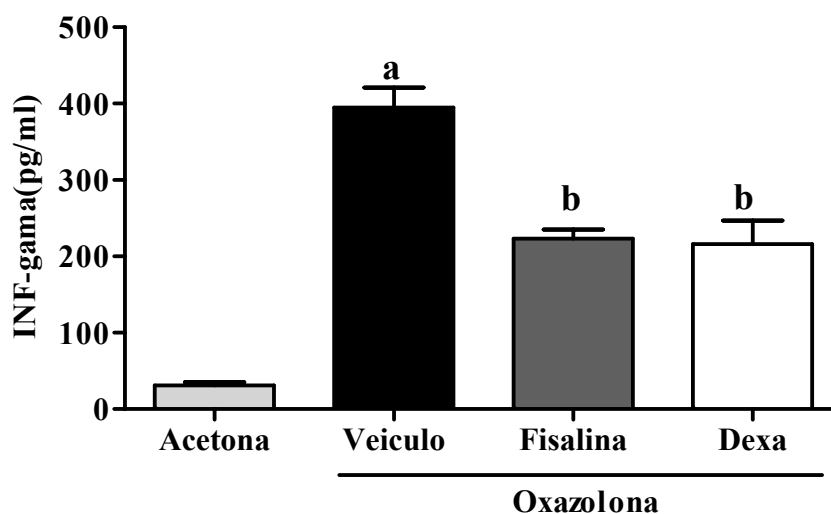


Figura 30 - Efeito da Fisalina E, administrada por via tópica, sobre os níveis teciduais de IFN- γ na dermatite alérgica induzida por oxazolona em camundongos

Nota: Seis dias após a sensibilização, a oxazolona (20 μ l/orelha de uma solução a 1% em uma mistura de acetona e azeite de oliva (4:1)) foi aplicada nos dois lados da orelha esquerda dos animais a cada três dias. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, 20 μ l/orelha), Fisalina E (0,5mg/orelha) e dexametasona (0,05mg/orelha) foram aplicados topicamente na orelha 30 min antes e três horas depois de cada aplicação de oxazolona. No último dia de tratamento, amostras de orelha (5 mm) foram coletadas para dosagem de IFN- γ . Foram utilizados 8 animais por grupo.^a p < 0,05 vs acetona; ^b p < 0,05 vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.5.3 Análise Histológica

A administração de oxazolona (20 μ L/orelha a 1% em uma mistura de acetona e azeite de oliva 4:1) induziu edema intenso além de hiperplasia da epiderme e infiltração de células inflamatórias tanto mononucleares como polimorfonucleares. O tratamento com dexametasona (0.05mg/orelha) e Fisalina E (0.5 mg/orelha) foi capaz de reduzir o edema e o infiltrado de células inflamatórias (**Figura 31**).

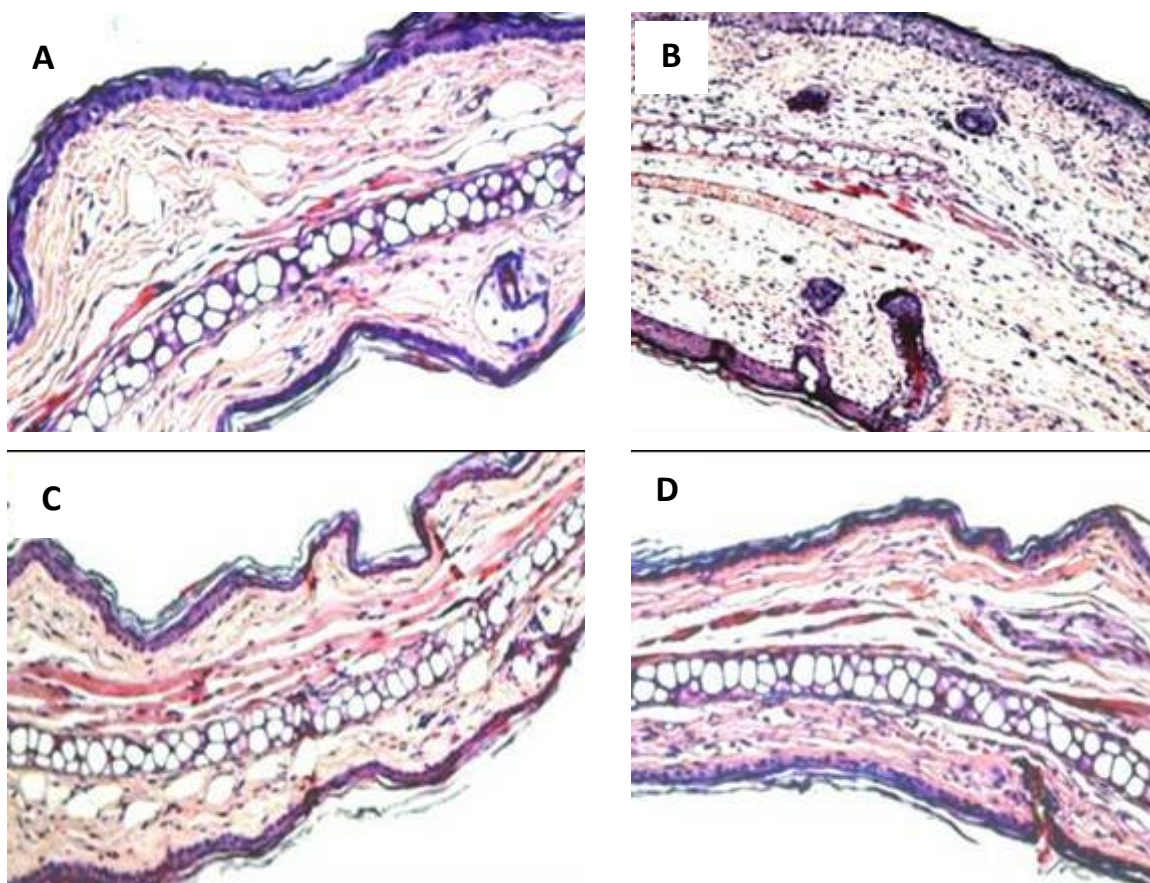


Figura 31 - Análise histológica de orelhas de camundongos submetidos à indução da dermatite de contato alérgica induzida por Oxazolona. A: Controle Normal; B: Oxazolona (OXA; 2,5 μ g/orelha) mostrando edema intenso na derme, hiperplasia da epiderme e infiltrado de células inflamatórias com presença de células mononucleares e polimorfonucleares; C: Fisalina E (0,5mg/orelha) + OXA; D: Dexametasona (0,05mg/orelha) + OXA. O tratamento com dexametasona e Fisalina E melhorou o edema e o infiltrado de células inflamatórias. Hematoxilina-eosina. x 100.

7 DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais é cada vez mais um recurso terapêutico de grande aceitação não só pela população, que há muito tempo lança mão dos produtos naturais para o tratamento de enfermidades, como também tem importância junto à comunidade científica, que investiga as suas propriedades biológicas e farmacológicas, comprovando sua segurança, eficácia, como também sua utilidade (CECHINEL; YUNES, 1998; KINGHORN, 2001).

A importância das plantas medicinais deve-se também por sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas plantas (FARNSWORTH; SOEJARTO, 1991).

Physalis angulata é uma erva amplamente distribuída ao longo do Brasil, possuindo grande valor popular devido a suas propriedades medicinais, inclusive atividade antiinflamatória (CHIANG et al., 1992a, 1992b; TOMASSINI et al., 2000; LORENZI et al., 2002; SOARES et al., 2003; WU et al., 2004). Seus extratos tem sido objeto de diversos estudos biológicos como antimicrobiano, antiinflamatório, imunomodulatório, antitumoral, tripanossomicida, hepatoprotetor e antinociceptivo (TOMASSINI et al., 2000; CHOI; HWANG, 2003; WU et al., 2004). Este amplo espectro de atividades biológicas é sem dúvida uma consequência da grande diversidade estrutural e funcional apresentada pelos vitaesteróides, lactonas sesquiterpênicas esteróidais, que são consideradas marcadores quimiotaxonômicos, não só do gênero *Physalis*, como de outros gêneros da família Solanaceae (CÁRDENAS et al., 1994). O reputado potencial biológico apresentado pelos extratos de *P. angulata* tem sido atribuído as fisalinas, constituintes químicos majoritários.

As lactonas sesquiterpênicas esteróidais são grupos de metabólitos secundários, que apresentam potencial para utilização na medicina, comprovado pelo amplo espectro de atividade farmacológica descrita, como as atividades antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória, antimalárica, antifúngica, além de efeitos no sistema nervoso central e cardiovascular (RÜNGELER et al., 1999).

Conhecendo a importância de *Physalis angulata* na medicina tradicional no tratamento de doenças relacionadas ao processo inflamatório e sabendo que as fisalinas são constituintes majoritários nesta planta, o objetivo deste trabalho foi avaliar pela primeira vez o potencial antiinflamatório da Fisalina E, lactona esteroidal isolada da *P. angulata*, na dermatite de contato induzida por TPA ou oxazolona em camundongos, modelos validados para a pesquisa de agentes úteis na dermatite de contato ou atópica (ZHANG, 1996; MURAKAWA et al., 2006).

Nas últimas décadas, a prevalência da dermatite atópica e alérgica ou dermatite de contato irritativa tem aumentado significativamente na população, causando consideráveis custos econômicos e diminuindo a qualidade de vida dos pacientes (MORTZ et al., 2001; KIEĆ-SWIERCZYŃSKA; GATES, 2007; PÓNYAI et al., 2007).

As drogas disponíveis para o tratamento da dermatite de contato irritativa, como os corticóides tópicos e inibidores da calcineurina, como tacrolimus e pimecrolimus, apesar de terem eficácia estão associados com efeitos colaterais. Portanto ainda se faz necessário o desenvolvimento de novos e seguros agentes para o tratamento da dermatite (BREUER et al., 2005; BUYS, 2007).

O processo inflamatório caracteriza-se por quatro sinais clássicos: calor, eritema, edema e dor. Assim, a utilização do edema como parâmetro de avaliação em modelos validados, como o modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos, permite avaliar o potencial antiinflamatório tanto por via tópica quanto sistêmica de vários agentes, sejam eles compostos sintéticos, extratos de plantas ou compostos isolados (GÁBOR, 2000; DE YOUNG et al., 1989). Além disso, quando o objetivo é o desenvolvimento de medicamentos de uso tópico, esse modelo oferece ainda a vantagem de identificar compostos que apresentam uma absorção cutânea apropriada de forma a atingir concentrações adequadas na pele para exercer um efeito farmacológico (BOUCLIER et al., 1990).

Assim, os modelos de inflamação cutânea permitem identificar compostos com atividade antiinflamatória que possam ser potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele, pois promovem condições que se assemelham com alguns tipos de dermatites observadas em humanos (VANE, 2000; BOUCLIER et al., 1990).

A dexametasona, um corticosteróide usado clinicamente no tratamento das desordens da pele, é conhecido por sua potente atividade antiinflamatória e imunossupressora, contudo seu efeito tópico pode causar intensa atrofia da pele, um dos importantes efeitos colaterais do seu uso em doenças crônicas (ASHWELL et al., 2000).

Estudos revelam que um grande percentual dos pacientes usa alguma forma de medicina alternativa e complementar para o tratamento da dermatite de contato e atópica, o que inclui o uso de plantas medicinais (VENDER, 2002; SIMPSON et al., 2003; NICOLAOU et al., 2004).

Vários compostos terpênicos, flavonóides, alcalóides, saponinas e lactonas sesquiterpênicas originados de plantas como *Egletes viscosa*, *Protium kleinii*, *Asparagus colchinchinensis*, *Ginkgo biloba*, *Berberis aquifolium* e *Tanaceum partheium* demonstraram eficácia em modelo de edema de orelha em camundongos induzido por vários agentes como ácido araquidônico, capsaicina, óleo de *Croton*, TPA ou oxazolona (MEDEIROS et al., 2007; LEE et al., 2007; KIM et al., 2006; SUR et al., 2009; RECIO et al., 2000; CALOU et al., 2008).

O modelo de edema de orelha induzido por TPA consiste num modelo útil para a triagem da atividade antiinflamatória de compostos que atuam na fase aguda da inflamação, bem como em processos inflamatórios hiperproliferativos (GÁBOR, 2000; MARKS, 1990).

A aplicação tópica do TPA induz uma resposta inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema já nas primeiras duas horas, seguido do aumento da espessura da orelha como resultado do extravasamento celular que atinge um pico máximo na sexta hora e tende a diminuir, atingindo os valores basais após 24 horas. A aderência dos leucócitos polimorfonucleares na parede dos vasos e a degranulação de mastócitos é verificada entre a 4^a. e 6^a. hora. No entanto, a infiltração máxima de leucócitos polimorfonucleares no tecido é atingida somente 24 horas após a aplicação tópica do TPA (YOUNG et al., 1983). O mecanismo preciso pelo qual o TPA exerce seu efeito é decorrente da ativação da PKC, bem como da ativação seqüencial da via da MAP quinase, fosfolipase A2, indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que por sua vez culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do TPA (MURAKAWA et al., 2006; DE BERNARDIS et al., 1994). A ativação da via da MAPK pela PKC, promove a ativação de

alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF-kB e a AP-1, os quais têm um papel central na regulação da produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, tais como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (PASCUAL; GLASS, 2006; GLASS; OGAWA, 2006; GARCIA-PIÑERES et al., 2001; SANCHEZ; MORENO, 1999). Enquanto a fosforilação da PLA₂ pela PKC resulta na liberação do AA seguida da produção de PG e LT via COX e LOX, respectivamente (WANG et al., 2001; YOUNG et al., 1984).

O acúmulo de neutrófilos e de leucócitos mononucleares no tecido cutâneo é uma característica comum no modelo de edema de orelha induzido por TPA e está relacionado com o aumento dos níveis de eicosanóides e da expressão da COX-2 (GÁBOR, 2000; SANCHEZ; MORENO, 1999). Assim, segundo Sanchez e Moreno (1999), compostos que inibem o influxo de leucócitos no tecido também suprimem a formação do edema e promovem a redução dos níveis de eicosanóides na área inflamada. A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos neutrófilos, que é comumente usada como um índice da infiltração de granulócitos, e sua inibição é um indicativo de atividade antiinflamatória (FUJII et al., 2002). Portanto, na tentativa de caracterizar o potencial antiinflamatório da Fisalina E, avaliamos seus efeitos no edema inflamatório induzido por TPA assim como no aumento dos níveis de TNF α e MPO na orelha de camundongos, além da análise histológica.

Os resultados mostram que a Fisalina E foi efetiva, por via tópica e oral, em todas as doses testadas, de maneira dose-dependente, na redução dos parâmetros inflamatórios da dermatite de contato induzida pelo TPA. Esta substância promoveu supressão do edema e da migração de neutrófilos (medida indiretamente pela MPO). O fato da Fisalina E reduzir os níveis de MPO inibindo, assim, a migração de neutrófilos é de grande importância, tendo em vista que o aumento do número de neutrófilos na pele tem grande relação com algumas doenças inflamatórias cutâneas como algumas dermatites e psoríase (RANG et al, 2007; SCHAERLI et al., 2004). Ao fazermos um pré-tratamento com um antagonista de receptor de estrógenos e progesterona, mifepristone, tanto a fisalina como a dexametasona tiveram seus efeitos antiinflamatórios anulados, indicando que o possível mecanismo de ação da Fisalina E envolve a ativação dos receptores de glicocorticóides, o que pode ser provável pela semelhança estrutural da Fisalina com a estrutura química dos glicocorticóides (GC). A estrutura química da Fisalina E confere relativa lipossolubilidade e capacidade de penetrar na célula para chegar até o receptor de GC que se encontra no citoplasma. Isso condiz com estudo anterior feito por

Souza et al 2005, em que o mecanismo de ação antiinflamatório das Fisolinas B e F no modelo de isquemia-reperfusão intestinal envolveu a ativação dos receptores de glicocorticóides.

A análise histológica dos tecidos das orelhas mostrou que a aplicação tópica do TPA resultou em um aumento da espessura da pele e do infiltrado de células inflamatórias, e que a Fisolina E e a dexametasona inibiram os parâmetros inflamatórios observados, quando aplicadas topicamente ou oralmente. O mifepristone reverteu os efeitos antinflamatórios da Fisolina E e da Dexametasona na análise histológica, fornecendo evidências da participação dos receptores de GC no mecanismo de ação da Fisolina E.

Estudos anteriores já demonstraram que as lactonas sesquiterpênicas esteroidais, como helenalina, isolada de plantas como *Arnica montana* e *A. chamissonis*, isohelenina e partenolide, originárias de *Artemisia ludoviciana* ssp, *Calea zaca-techichi* e *Polymnia maculata* e ergolide da *Inula britannica* (HAN et al., 2001; GUIDO et al., 1998; BORKA et al., 1997) possuem atividade antiinflamatória ao bloquear a transcrição do DNA, através da inibição do NF- κ B, este fator é um importante na regulação da expressão de genes pró-inflamatórios responsáveis por síntese de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e espécies reativas de oxigenio (GHOSH et al., 1998; KOCH et al., 2001). Os resultados da imunohistoquímica para NF- κ B mostraram que tanto a fisolina E como a dexametasona reduziram a marcação deste fator nuclear e que o pré-tratamento com mifepristone reverteu esse efeito, indicando que a Fisolina E, possivelmente, atua de modo semelhante a essas lactonas sesquiterpênicas esteroidais, inibindo a ativação do NF- κ B, este fato pode ter envolvimento com a participação dos receptores GC, já que o mifepristone reverteu os efeitos da Fisolina E. Jacobo-Herrera et al (2006) mostrou que o efeito antiinflamatório das Fisolinas B e F, isolada da *Witheringia solanácea*, envolveu a inibição da cascata do NF- κ B, e recentemente, a Fisolina B, isolada da *Physalis angulata*, demonstrou capacidade de inibir a ativação do NF- κ B (VANDENBERGUE et al., 2008). O mecanismo pelo qual a Fisolina causa inibição do NF- κ B pode ter dois caminhos possíveis, através da inibição da translocação do NF- κ B para o núcleo via estabilização do complexo NF- κ B/I κ B, interferindo na fosforilação e degradação do I κ B ou pode exercer uma modificação direta na atividade do NF- κ B, inteferindo na ligação desta com o DNA, como é o caso da helenalina (LYSS et al., 1998), contudo estudos são necessários para a confirmação dessas hipóteses.

O TPA aumenta a expressão de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 α , GM-CSF, COX-2 e TNF- α (OBERYSZYN et al., 1993; VASUNIA et al., 1994; WILMER et al., 1994; SCHOLZ et al., 1995). A IL-1 e o TNF- α são citocinas capazes de ativarem mecanismos efetores para diferentes alvos da inflamação cutânea (KUPPER, 1990; CORSINI; GALLI, 2000). Vários modelos experimentais, que fazem uso de uma variedade de irritantes, provocam a liberação de TNF- α (WILME et al., 1994; HUNZIKER et al., 1992; ENK; KATZ, 1992; LISBY et al., 1995).

O TNF- α é um mediador crítico das reações de irritação da pele (Piquet et al., 1991), sendo uma importante citocina liberada na dermatite de contato irritativa (McFADDEN; BASKETTER, 2000). Lewis et al. (1993) demonstraram que esta citocina é liberada pelos queratinócitos *in vitro* em resposta a irritantes e que também pode ser liberada pelos queratinócitos em resposta aos lipopolissacarídeos (KOCK et al., 1990), sendo uma citocina pró-inflamatória que ativa as células T, macrófagos e granulócitos, induzindo a expressão alterada de moléculas de adesão e liberação de outras citocinas (GROVES et al., 1995). No presente estudo, a Fisalina E, foi efetiva, por via tópica e via oral, em reduzir os níveis teciduais de TNF- α , resultado comprovado tanto através da dosagem (através de ELISA) quanto na marcação para TNF α na imunohistoquímica, e com isso reduzir a resposta inflamatória induzida pelo TPA. Algumas lactonas sesquiterpênicas esteroidais já foram descritas com atividade inibidora sobre o TNF α como as presentes no extrato da *Tanacetum partheium* (SUR et al., 2009).

A inflamação aguda é uma resposta rápida frente a diversos agentes ou estímulos que envolvem o recrutamento e ativação de neutrófilos. No entanto, quando o estímulo não é eliminado o processo inflamatório persiste, tornando-se crônico. A principal característica da transição do processo inflamatório agudo para crônico é a mudança na composição do infiltrado leucocitário, onde os neutrófilos são substituídos por células mononucleares fagocíticas e linfócitos T (POBER; SESSA, 2007). Stanley et al. (1991) demonstrou que a aplicação múltipla do TPA em dias alternados durante 10 dias produz um modelo de dermatite de contato irritativa crônica. Neste modelo, a Fisalina E, por via oral e tópica, reduziu o edema de orelha e a atividade da MPO, semelhante ao que aconteceu no modelo de dermatite aguda por TPA, demonstrando que a Fisalina E foi efetiva não só na dermatite de contato aguda, mas também na crônica.

O modelo de edema de orelha induzido pela oxazolona mimetiza a reação de hipersensibilidade de contato do tipo tardia, caracterizada por uma resposta imunológica mediada por células, acompanhada de infiltração celular e liberação de diversas citocinas (RANG et al., 2007; ABBAS; LICHTMAN, 2005). Duas fases dissociadas temporoespacialmente são necessárias para atingir uma reação de hipersensibilidade máxima: a fase de sensibilização e a fase efetora. A fase de sensibilização ocorre no primeiro contato da pele com a oxazolona e é a fase responsável pela expansão das células T no linfonodo. A oxazolona aplicada topicamente penetra na epiderme onde é captada pelas células apresentadoras de antígenos (células de Langerhans), que migram para os linfonodos de drenagem e apresentam as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) associadas à oxazolona aos precursores de células T específicas (linfócitos T CD4 e CD8 imaturas), onde estas são ativadas e expandem-se no linfonodo sob influência da IL-12, sendo a partir desse momento designadas de células T “sensibilizadas” (RANG et al., 2007; TUCKERMANN et al., 2007; HENNINO et al., 2005). A fase efetora ocorre após o contato subsequente com a oxazolona, que induz a produção de quimiocinas, ativação de células endoteliais e de mastócitos, que resultam na ativação da microvasculatura, permitindo a infiltração dos leucócitos nas primeiras duas horas. Em resposta a algumas citocinas, os linfócitos T sensibilizados migram para a derme e são re-estimulados pelas células de Langerhans residentes, onde passam a secretar mediadores pro-inflamatórios que promovem uma segunda infiltração maciça de leucócitos (TUCKERMANN et al., 2007; HENNINO et al., 2005). Algumas citocinas secretadas pelos linfócitos T ativados tais como a IL-2, TNF- β e IFN γ promovem a ativação dos macrófagos e estes, por sua vez, estimulam a inflamação aguda por meio da secreção de outras citocinas, principalmente TNF- α e IL-1, quimiocinas, prostaglandinas e leucotrienos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; DEBENEDICTS et al., 2001).

A sensibilização dos camundongos pela aplicação repetida de oxazolona produz uma hipersensibilização por contato caracterizada por extravasamento plasmático (edema), hiperplasia epidérmica, infiltração de células inflamatórias como monócitos, granulócitos e macrófagos, além do aumento da população de linfócitos T (CD8+) nos linfonodos (SHIN, 2005; FUJII et al., 2002; WANG et al., 2000).

O modelo de dermatite induzido por oxazolona descrito por Fujii et al. (2002), possui como principal característica, a hiperplasia da epiderme, devido ao aumento na proliferação dos

queratinócitos onde o INF- γ possui importância crucial. Além de edema persistente, ocorre infiltração marcante de células inflamatórias como monócitos, granulócitos e macrófagos.

O modelo de edema de orelha é utilizado para identificar potenciais agentes antialérgicos baseados na capacidade de redução do espessamento da orelha de animais sensibilizados (KIMBER et al., 1999).

No presente estudo a oxazolona aplicada a animais sensibilizados induziu um aumento na espessura da orelha que atingiu um nível máximo 13 dias após a sensibilização. A aplicação tópica e oral da Fisalina E reduziu o aumento na espessura da orelha e hiperplasia epidérmica, assim como o aumento nos níveis de IFN- γ induzidos pela oxazolona. A oxazolona produziu edema na derme, hiperplasia da epiderme e infiltrado de células inflamatórias com presença de células mononucleares e polimorfonucleares, com a administração de Fisalina E e dexametasona houve redução do edema e do infiltrado de células inflamatórias. Estudos anteriores já demonstraram que as lactonas sesquiterpênicas esteroidais, como as isoladas de *Vernonia scorpioides*, tem atividade antiinflamatória/imunossupressora na dermatite de contato alérgica induzida por oxazolona em camundongos (RAUH, 2008).

Estudos feitos pela Profa. Leticia Lotufo do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da UFC demonstraram que a Fisalina E não é citotóxica em células de linhagem humana, o que a torna uma substância antiinflamatória interessante para poder ser utilizada em seres humanos, mas estudos adicionais ainda são necessários para melhor avaliar a sua toxicidade e sua eficácia em seres humanos.

Este estudo mostra pela primeira vez que a Fisalina E possui uma atividade antiinflamatória e imunomodulatória, tanto por via oral como tópica, na dermatite de contato irritativa aguda e crônica induzida por TPA e na dermatite de contato alérgica induzida por oxazolona, que a torna uma substância promissora a ser utilizada no tratamento de dermatites ou servir como droga protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, estudos adicionais são necessários para melhor elucidar o mecanismo de ação pelo qual a Fisalina E exerce seus efeitos, bem como estudos que comprovem a segurança do seu uso em humanos.

8 CONCLUSÕES

- ❖ Este estudo mostra pela primeira vez a eficácia da administração tópica e oral da Fisalina E em modelos murinos de dermatite induzida por TPA ou oxazolona.
- ❖ A Fisalina E demonstrou pronunciada atividade antiinflamatória na dermatite de contato irritativa aguda e crônica induzida por TPA, inibindo a hiperplasia epidérmica, a migração de neutrófilos e a reduzindo os níveis teciduais de TNF- α , além de melhorar as modificações histológicas induzidas pela aplicação do TPA.
- ❖ O pré-tratamento com Mifepristone, antagonista de receptores de estrógenos e progesterona, no modelo da dermatite de contato aguda induzida por TPA, foi capaz de reverter o efeito antiinflamatório da Fisalina E, demonstrando a possível participação destes receptores no mecanismo de ação da Fisalina E.
- ❖ A Fisalina E reduziu a marcação de TNF- α e NF- κ B na análise imunohistoquímica dos tecidos de orelha submetidos a dermatite de contato aguda por TPA.
- ❖ No modelo de dermatite de contato alérgica induzida por oxazolona, a Fisalina E, administrada por via tópica e oral, apresentou atividade antiinflamatória evidenciada pela redução da hiperplasia epidérmica e dos níveis teciduais de INF- γ , além da melhora nos parâmetros histológicos analisados.
- ❖ O mecanismo de ação da Fisalina E pode estar relacionado à habilidade de ativar o receptor de glicocorticóides, suprimindo a síntese de mediadores inflamatórios, contudo outros estudos são necessários para a confirmação desta hipótese.
- ❖ Este estudo fornece evidências de que a Fisalina E, isolada da *Physalis angulata*, possa no futuro demonstrar eficácia terapêutica em desordens inflamatórias da pele como as dermatites de contato e psoríase.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro Elsevier, 2005.
- AGNER, T.; SERUP, J. Seasonal variation of skin resistance to irritants. **Br. J. Dermatol.**, v. 21, p. 323-328, 1989.
- AKAMATSU, H.; KOMURA, J.; ASADA, Y. Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. **Plant. Med.**, v.97, p.119-121, 1991.
- ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R.P.; MENCHERINI, T.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 5, p. 18-23, 2007
- AMMON, H. P. T.; KAUL, R. Pharmakologie der Kamille und ihrer Inhaltsstoffe. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 132, suppl. 27, p. 3-26, 1992.
- ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Antiinflatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einstein**, v. 6, Supl. 1, p. 159-165, 2008.
- ASHTON, H.; FRENK, E.; STEVENSON, C. Therapeutics: XIII. Urea as a topical agent. **Br. J. Dermatol.**, v. 84, p. 194-196, 1971.
- ASHWELL, J. D.; LU, F. W.; VACCHIO, M. S. Glucocorticoids in T cell development and function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 309-345, 2000.
- BÁNVÖLGYI, A.; PÁLINKÁS, L.; BERKI, T.; CLARK, N.; GRANT, A. D.; HELYES, Z.; POZSGAI, G.; SZOLCSÁNYI, J.; BRAIN, S. D.; PINTÉR, E. Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. **J. Neuroimmunol.**, v. 169, n. 1/2, p. 86-96, 2005.
- BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, p. 1066-1071, 1997.
- BAS, E.; RECIO, M. C.; MÁNEZ, S.; GINER, R. M.; ESCANDELL, J. M.; LOPEZ-GINES, C.; RIOS, J. L. New insight into the inhibition of the inflammatory response to experimental delayed-type hypersensitivity reactions in mice by scopolioside A. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 555, p. 199-210, 2007.
- BASEY, K.; MCGAW, B. A.; WOOLLEY, J. G. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4173-4176, 1992.
- BASTOS, G. N.; SILVEIRA, A. J.; SALGADO, C. G.; PICANÇO-DINIZ, D. L.; DO NASCIMENTO, J. L. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, n. 2, p. 246-251, 2008.

- BEDI, M. K.; SHENEFELT, P. D. Herbal therapy in dermatology. **Arch. Dermatol.**, v. 138, p. 232-242, 2002.
- BECKER, P. F. L. Inflamação. **Patologia geral**. São Paulo: Sarvier, 1997. p.140-193.
- BELSITO, D. V. The diagnostic evaluation, treatment, and prevention of allergic contact dermatitis in the new millennium. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 105, p. 409- 420, 2000.
- BERARDESCA, E.; MAIBACH, H. L. Racial differences in sodium lauryl sulphate induced cutaneous irritation: black and white. **Contact Dermatitis**, v. 18, p. 65-70, 1988.
- BINGEFORS, K.; LINDBERG, M.; ISACSON, D. Self-reported dermatological problems and use of prescribed topical drugs correlate with decreased quality of life: an epidemiological survey. **Br. J. Dermatol.**, v. 147, p. 285-290, 2002.
- BLUMENTHAL, R. **The complete German Commission E monographs**. New York: American Botanical Council, 2003.
- BONISH, B.; JULLIEN, D.; DUTRONC, Y.; HUANG, B. B.; MODLIN, R.; SPADA, F. M.; PORCELLI, S. A.; NICKOLOFF, B. J. Overexpression of cd1d by keratinocytes in psoriasis and cd1d – dependent inf – γ production by nk-t cells. **J. Immunol.**, v. 165, p. 4076 – 4085, 2000.
- BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 42, p. 127-154, 1990.
- BORKA, P. M.; SCHMITZ, M. L.; KUHN, M.; ESCEHRB,C.; HEINRICH, M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. **FEBS Lett.**, v. 402, p. 85-90, 1997.
- BRADLEY P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, p. 206–209, 1982.
- BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. 3. ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976. (Coleção Mossoroense, v. 42).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 6, de 31 de janeiro de 1995. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 fev. 1995. v. 200, seção 1, p. 1523–1524.
- BREUER K.; WERFEL T.; KAPP, A. Safety and efficacy of topical calcineurin inhibitors in the treatment of childhood atopic dermatitis. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 6, p. 65-77, 2005.
- BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.
- BURBACH, G. J.; ANSEL, J. C.; ARMSTRONG, C. A. Cytokines in the skin. **The biology of the skin**. 1st ed. New York: Parthenon Publishing Group, 2000. p. 299-319.

- BURKHART, C. G.; BURKHART, H. R. Contact irritant dermatitis and anti-pruritic agents: the need to address the itch. **J. Drugs Dermatol.**, v. 2, n. 2, p. 143-146, 2003.
- BUYS, L. M. Treatment options for atopic dermatitis. **Am. Fam. Physician.**, v. 75, p. 523-528, 2007.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131–134, 2005.
- CALOU, I. B. F.; SOUSA, D. I. M.; CUNHA, G. M. A.; BRITO, G. A. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Topically Applied Diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) Attenuate the Dermal Inflammation in Mouse Ear Induced by Tetradecanoylphorbol 13-Acetate- and Oxazolone. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 8, p.1511—1516, 2008.
- CÁRDENAS, J.; ESQUÍVEL, B.; GUPTA, M.; RAY, A. B.; HAHN, L. R. **Progress in the chemistry of organic natural products**. New York: Springer-Verlag, 1994. v. 63.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para ativação da atividade. **Quim. Nova**, v. 21, n. 1, p. 99, 1998.
- CHATURVEDI, S. K.; SINGH, G.; GUPTA, N. Stigma experience in skin disorders: an Indian perspective. **Dermatol. Clin.**, v. 23, p. 635-642, 2005.
- CHERRY, N.; MEYER, J. D.; ADISESH, A.. Surveillance of occupational skin disease: EPIDERM and OPRA. **Br. J. Dermatol.**, v. 142, p. 1128-1134, 2000.
- CHIANG, H. C.; JAW, S. M.; CHEN, P. M. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. **Anticancer Res.**, v. 12, n. 4, p.1155-1162,1992a.
- CHIANG, H. C.; JAW, S. M.; CHEN, C. F.; KAN, W. S. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. **Anticancer Res.**, v. 12, n. 3, p. 837-843,1992b.
- CHOUDHARY, M. I.; YOUSAF, S.; AHMED, S.; Yasmeen, K. Atta-ur-Rahman. Antileishmanial physalins from *Physalis minima*. **Chem. Biodivers.**, v. 2, p. 1164-1173, 2005.
- CHOUDHARY, M. I.; YOUSAF, S.; AHMED, S.; Atta-Ur-Rahman . New leishmanicidal physalins from *Physalis minima*. **Nat. Prod. Res.**, v. 21, p. 877-883, 2007.
- CHUANG, D.M. Neurotransmitter receptors and phosphoinositide tunorver. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 29, p. 71-110, 1989.
- CHUONG, C. M.; NICKOLOFF, B. J.; ELIAS, P. M.; GOLDSMITH, L. A.; MACHER, E.; MADERSON, P. A.; SUNDBERG, J. P.; TAGAMI, H.; PLONKA, P. M.; THESTRUPPEDERSON, K.; BERNARD, B. A.; SCHRODER, J. M.; DOTTO, P.; CHANG, C. M.; WILLIAMS, M. L.; FEINGOLD, K. R.; KING, L. E.; KLIGMAN, A. M.; REES, J. L.; CHRISTOPHERS, E. What is the “true” function of skin? **Exp. Dermatol.**, v. 11, p. 159-187, 2002.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 729–837, 2004.

- COHEN, D. E.; HEIDARY, N. Treatment of irritant and allergic contact dermatitis **Dermatol. Therapy**, v. 17, p. 334–340, 2004.
- CORSINI, E.; GALLI, C. L. Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. **Toxicology**, v. 142, p. 203–211, 2000.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, N. J.; WEISS, R. B. Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. **Semin. Oncol.**, v. 24, n. 2, p. 156-63, 1997.
- DALGARD, F.; SVENSSON, A.; HOLM, J. O.; SUNDBY, J. Selfreported skin morbidity among adults: associations with quality of life and general health in a Norwegian survey. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, v. 9, p. 120-125, 2004.
- DAMU, A. G.; KUO, P. C.; SU, C. R.; KUO, T. H.; CHEN, T. H.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H.; WU, T. S. Isolation, structures, and structure - cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1146-1152, 2007.
- DATTNER, A. M. Herbal and complementary medicine in dermatology. **Dermatol. Clin.**, v. 22, n. 3, p. 325-332, 2004.
- DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents Actions**, v. 42, n. 1/2, p. 29-33, 1994.
- DE KLOET, E. R.; SUTANTO, W.; VAN DEN BERG, D. T.; CAREY, M. P.; VAN HAARST, A. D.; HORNSBY, C. D. Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 47, n. 1/6, p. 183-190, 1993.
- DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, p. 335- 341, 1989.
- DEBENEDICTS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. Immune functions of the skin. **Clin. Dermatol.**, v. 19, p. 573-585, 2001.
- DELHASE, M.; WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **I κ B kinase and NF- κ B signaling in response to pro-inflammatory cytokines**: inflammation protocols. New Jersey: Humana Press, 2003.
- DISEPIO, D.; CHANDRARATNA, R. A.; NAGPAL, S. Novel approaches for the treatment of psoriasis. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 222-231, 1999.
- DI STASI, L. C.; HIRUIMA, C. A.; SANTOS, E. M. G. Medicinal Plants populary used in brasilian amazon. **Fitoterapia**, v. 65, n. 6, p. 529-540, 1994.
- DOGRA, A.; MINOCHA, Y. C.; KAUR, S. Adverse reactions to cosmectis. **Indian J. Dermatol. Leprol.**, v. 69, n. 2, p. 165-167, 2003.

- DIAS, B. F. S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades.** Campinas: André Tosello, 1996.
- DUARTE, I.; LAZZARINI, R.; BUENSE, R.; PIRES, M.C. Dermatite de contato. **An. Bras. Dermatol.**, v.75, n. 5, p. 529-548, 2000.
- DUMONT, F.; STARUCH, M.; KOPRAK, S.. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK 506 and rapamucin. **J. Immunol.**, v. 144, p. 251– 258, 1990.
- ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. Does the tail wag the dog? Role of the barrier in the pathogenesis of inflammatory dermatoses and therapeutic implications. **Arch. Dermatol.**, v. 137, p. 1079-1081, 2001.
- ENK, A. H.; KATZ, S. I. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 1398–1402, 1992.
- ENGLISH, J. S. C. Current concepts in contact dermatitis. **Br. J. Dermatol.**, v. 145, p. 527–529, 2001.
- ENGLISH, J. S. C. Current concepts of irritant contact dermatitis. **Occup. Environ. Med.**, v. 61, p. 722-726, 2004.
- EVANS, F. J.; SOPER, C. J. The tiglane, daphnanes and ingenanes; their chemistry, distribution and biological activities: A review. **Lloydia**, v. 41, p. 193, 1978.
- EVANS, F. J.; SCHMIDT, R. J. An assay procedure for the comparative irritancy testing of esters in the tiglane and daphnane series. **Inflammation**, v. 3, p. 215, 1979.
- EVANS, W. C. Orders and families of medicinal plants; animal-derived drugs. In: EVANS, W. C. (Ed.). **Pharmacognosy: Trease and Evans pharmacognosy.** 14th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. cap. 2, p. 28-55.
- FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. The Environmental interface: regulation of permeability barrier homeostasis. MAILBACH, H. I. (Ed.). **Dry skin and moisturizers: Chemistry and function.** Boca Raton: 2000. p. 45-58.
- FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.
- FIRESTEIN, G. S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. In: GOLDMAN, L.; ANSIELLO, D. **Textbook of medicine.** 22nd ed. Cidade: editora, 2004. p. 227.
- FOX, L. P. Farmacologia dermatológica. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica.** 11. ed. Rio de Janeiro:McGrawHill, 2006. p. 1534-1537.

- FREINKEIL, R. K.; WOODLEY, D. T. Introduction. In: FREINKEIL, R. K.; WOODLEY, D.T. **The Biology of the Skin**. 1st ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000. p.15-17.
- FUJII, Y.; TAKEUCHI, H.; TANAKA, K.; SAKUMA, S.; OHKUBO, Y.; MUTHO, S. Effects of FK – 506 (Tacrolimus Hydrate) on chronic oxazolone induced dermatitis in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 456, p. 115-121, 2002.
- FUNK, J. O.; MAIBACH, H. I. Horizons in pharmacologic interventions in allergic contact dermatitis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, n. 6, p. 999-1024, 1994.
- GÀBOR, M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.
- GATES T. Atopic dermatitis: diagnosis, treatment, and aeromedical implications. **Aviat. Space Environ. Med.**, v. 78, p. 29-37, 2007.
- GARCIA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MORAES, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF-KB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 39713-39720, 2001.
- GHADIALLY, R.; HALKIER-SORENSEN, L.; ELIAS, P. Effects of petrolatum on stratum corneum structure and function. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 26, p. 387– 396, 1992.
- GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E. B. NF- κ B and REL proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 225–260, 1998.
- GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 44-55, 2006.
- GOTTLIEB, A. B. Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 53 , p. S3-16, 2005.
- GRABBE, S.; SCHWARZ, T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. **Immunol. Today**, v. 19, p. 37-44, 1998.
- GROVES, R. W.; RAUSCHMAYR, T.; NAKAMURA, K.; SARKAR, S.; WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Inflammatory and hyperproliferative skin disease in mice that express elevated levels of the IL-1 receptor (Type I) on epidermal keratinocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 2, p. 336-344, 1996.
- GROVES, R.W.; ALLEN, M. H.; ROS, E. L.; BARKER, J. N.; MACDONALD, D. M. Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. **Br. J. Dermatol.**, v. 132, p. 345– 352, 1995.
- GUIDO, L.; KNORRE, A.; SCHMIDT, T. J.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. The Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactone Helenalin Inhibits the Transcription Factor NF- κ B by Directly Targeting p65. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 33508–33516, 1998.

GUIMARÃES, E. T.; LIMA, M. S.; SANTOS, L. A.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. B.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; DOS SANTOS, W. L.; SOARES, M. B. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 64, n. 1, p. 84-87, 2009.

HAAKE, A.; SCOTT, G. A.; HOLBROOK, K. A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. In: FREINKEIL, R. K.; WOODLEY, D. T. **The Biology of the Skin**. 1st ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000. p.15-17.

HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. **JID Symp. Proc.**, v. 10, p. 2, 2005.

HAN, J. W.; LEE, B. G.; KIM, Y. K.; TOON, J. W.; JIN, J. K.; HONG, S.; LEE, H. Y.; LEE, K. R.; LEE, H. W. Ergolide, sesquiterpene lactone from *Inula britannica*, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages through the inactivation of NF- κ B. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, p. 503-512, 2001.

HAWKES, J. G. **Solanaceae III taxonomy chemistry evolution**. Richmond, Surrey, UK: The Royal Botanic Gardens Kew, 1991.

HEILMANN, J.; MERFORT, I.; HAGERDORN, U.; LIPPOLD, B.C. In vivo skin penetration studies of chamomile flavonoids. **Plant. Med.**, v. 59, suppl., p. A638, 1993.

HENNINO, A.; VOCANSON, M.; CHAVAGNAC, C.; SAINT-MEZARD, P.; DUBOIS, B.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica: papel das células T CD8 efetora e das células T CD4 regulatórias. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, n. 4, p. 335-347, 2005.

HEWITT, H.; WHITTLE, S.; LOPEZ, S.; BAILEY, E.; WEAVER, S. Topical use of papaya in chronic skin ulcer therapy in Jamaica. **West Indian Med. J.**, v. 49, n. 1, p. 32-33, 2000.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 143-201, 1991.

HSU, S. Green tea and the skin. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, n. 6, p. 1049-1059, 2005.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, n.11, p. 1349-1353, 1981.

HUNZIKER, T.; BRAND, C. U.; KAPP, A.; WAELTI, E. R.; BRAATHEN, L. R. Increased levels of inflammatory cytokines in human skin lymph from sodium lauryl sulphate-induced contact dermatitis. **Br. J. Dermatol.**, v. 127, p. 254-257, 1992.

HUTCHINGS, C. V.; SHUM, K. W.; GAWKRODGER, D. J. Occupational contact dermatitis has an appreciable impact on quality of life. **Contact Dermatitis**, v. 45, p. 17-20, 2001

ISMAIL, N.; ALAM, M. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 676-679, Aug. 2001.

IZUMI, T.; SAITO, M.; OBATA, A.; ARII, M.; YAMAGUCHI, H.; MATSUYAMA, A. Oral intake of soy isoflavone aglycone improves the aged skin of adult women. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, Tokyo, v. 53, n. 1, p. 57-62, 2007.

JACOBO-HERRERA, N. J.; BREMMER, P.; MARQUEZ, N.; GUPTA, M. P.; GIBBONS, S.; MUNOZ, E.; HEINRICH, M. Physalins from *Witheringia solanacea* as modulators of the NF-kappaB cascade. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 328-331, 2006.

KATOH, N. Future perspectives in the treatment of atopic dermatitis. **J. Dermatol.**, v. 36, p. 367-376, 2009.

KIEĆ-SWIERCZYŃSKA M.; KRECISZ B.; SWIERCZYŃSKA-MACHURA D. Contact allergy to paraphenylenediamine: a 10-year observation held in the Nofer Institute of Occupational Medicine, **Lódź. Australas J. Dermatol.**, v. 48, p. 83-87, 2007

KIMA, S.; KIMA, Y.; KIMA, J. E.; CHOA, K. H.; CHUNGA, J. H. Berberine inhibits TPA-induced MMP-9 and IL-6 expression in normal human keratinocytes **Phytomedicine**, v.15, p.340-347, 2008.

KIMBER, I.; PICHOWSKI, J. S.; BASKETTER, D. A.; DEARMAN, R. J. Immuneresponses to contact allergens: novel approaches to hazard evaluation **Toxicol. Lett.**, v. 106, p. 237-246, 1999.

KINGHORN, A. D. J. Pharmacognosy in the 21 century. **Pharm. Pharmacol.**, v. 53, p. 135-148, 2001.

KITAGAKI, H.; ONO, N.; HAYAKAWA, K.; KITAZAWA, T.; WATANABE, K.; SHIOHARA, T. Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. **J. Immunol.**, v. 159, n. 5, p. 2484-2491, 1997.

KOCH, E.; KLAAS, C. A.; RUNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; VICHNEWSKI, W.; MERFORT, I. Inhibition of inflammatory cytokine production and lymphocyte proliferation by structurally different sesquiterpene lactones correlates with their effect on activation of NF-kappaB. **Biochem. Pharmacol.**, v.62, p.795-801, 2001.

KOCK, A.; SCHWARZ, T.; KIRNBAUER, R. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: Evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 1609-1614, 1990.

KOMATSU, H.; KOO, A.; GHADISHAH, E.; ZENG, H.; KUHLENKAMP, J.F.; INOUE, M., GUTH, P.H.; KAPLOWITZ, N. Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for a role for superoxide free radicals. **Am. J. Physiol.**, v. 262, n. 4 , p. 669-676, 1992.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **Eur. J. Cell. Biol.**, v.83, p. 625-629, 2004.

KUNTZ, D.; BRASSFIELD, T. Hydration of macromolecules: II. Effects of urea on protein hydration. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 142, p. 660-664, 1971.

- KUO, P. C.; KUO, T. H.; DAMU, A. G.; SU, C. R.; LEE, E. J.; WU, T. S.; SHU, R.; CHEN, C. M.; BASTOW, K. F.; CHEN, T. H.; LEE, K. H. Physanolide A, a novel skeleton steroid, and other cytotoxic principles from *Physalis angulata*. **Org. Lett.**, v. 8, p. 2953-2956, 2006.
- KUPPER, T. S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and Speculations. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 1783-1789, 1990a.
- KUPPER, T. S. The role of epidermal cytokines. In: SHEVACH, E.; OPPENHEIM, N. **Immunophysiology: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation.** New York: Oxford University Press, 1990b. p. 285-305.
- JANOFF, A.; KLASSEN A.; TROLL, W. Local vascular changes induced by the cocarcinogen, phorbol myristate acetate. **Cancer Res.**, v. 30, p. 2568, 1970.
- LACHMAN, Y.; BANERJEE, P.; POULTER, L.W. Association of immunological changes with clinical efficacy in atopic eczema patients treated with traditional Chinese herbal therapy (Zemaphyte). **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 109, p. 243-249, 1996.
- LAMMINTAUSTA, K.; MAIBACH, H. I.; WILSON, D. Irritant reactivity in males and females. **Contact Dermatitis**, v. 17, n. 5, p. 276-280, 1987.
- LAMMINTAUSTA, K.; MAIBACH, H.I.; WILSON, D. Susceptibility to cumulative and acute irritant dermatitis. **Contact Dermatitis**, v. 19, n. 2, p. 84-90, 1988.
- LEE, D. Y.; CHOI, G.; YOON, T.; CHEON, M. S.; CHOO, B. K.; KIM, H. K. Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 123, p. 149-154, 2009.
- LEE, D. Y.; CHOO, B. K.; YOON, T.; CHEON, M. S.; LEE, H. W.; LEE, A. Y.; KIM, H. K. Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 121, p. 28-34, 2007.
- LEITE, R. M. S.; LEITE, A. A. C.; COSTA, I. M. C. Dermatite atópica: uma doença cutânea ou uma doença sistêmica? A procura de respostas na história da dermatologia. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, p.71-78, 2007.
- LEUNG, D. Y. M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWEL, M. D.; NOMURA, I.; HAMUD, Q. A. New insights into atopic dermatitis. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 651-657, 2004.
- LEVEQUE, J. L.; CORCUFF, P.; DE RIGAL, J.; AGACHE, P. In vivo studies of evolution of physical properties of human skin with age. **Int. J. Dermatol.**, v. 23, p. 322-329, 1984.
- LEVIN, C. Y.; MAIBACH, H. I. Irritant contact dermatitis: is there an immunologic component? Review. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 183- 189, 2002.
- LEWIS, R. W.; MCCALL, J. C.; BOTHAM, P. A.; KIMBER, I. Investigation of TNF alpha release as a measure of skin irritancy. **Toxicol. in Vitro**, v. 7, p. 393-395, 1993.
- LIM, H.; SON, K. H.; CHANG, W. H.; KANG, S. S.; KIM, H. P. Effects of Anti-inflammatory Biflavonoid, Ginkgetin, on Chronic Skin Inflammation **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 5, p.1046-1049, 2006.

- LIM, Y. L.; GOON, A. Occupational skin diseases in Singapore 2003-2004: an epidemiologic update. **Contact Dermatitis**, v. 56, n. 3, p. 157–159, 2007.
- LIN, Y. S.; CHIANG, H. C.; KAN, W. S.; HONE, E.; SHIH, S. J.; WON, M. H. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L extract. **Am J. Chin. Med.**, v. 20, n. 3/4, p. 233-243, 1992.
- LINDBERG, M.; TAMMELA, M.; BOSTROM, A.; FISHER, T.; INEROT, A.; SUNDBERG, K.; BERNE, B. Are adverse skin reactions to cosmetics underestimated in the clinical assessment of contact dermatitis? A prospective study among 1075 patients attending Swedish patch test clinics. **Acta Derm. Venereol.**, v. 84, n. 4, p. 291- 295, 2004.
- LISBY, S.; MULLER, K. M.; JONGENEEL, C. V.; SAURAT, J. H.; HAUSER, C. Nickel and skin irritants up-regulate tumor necrosis factor- α mRNA in keratinocytes by different but potentially synergistic mechanisms. **Int. Immunol.**, v. 7, p. 343–352, 1995.
- LYSS, G.; KNORRE, A.; SCHMIDT, T. J.; PAHL, H.L.; MERFORT, I. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65. **J. Biol. Chem.**, v.273, n. 50, p. 33508-33516, 1998.
- LODEN, M.; LINDBERG, M. The influence of a single application of different moisturizers on the skin capacitance. **Acta Derm. Venereol.**, v. 71, p. 79– 82, 1991.
- LODEN, M. Barrier recovery and influence of irritant stimuli in skin treated with a moisturizing cream. **Contact Dermatitis**, v. 36, n. 5, p. 256– 260, 1997.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. 1. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.
- LOVELL, P.; VENDER, R. B. Management and treatment of pruritus. **Skin Therapy Lett.**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2007.
- MAGALHÃES, H. I.; VERAS, M. L.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L.V.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C. In-vitro and in-vivo antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 8, p. 2953-2956, 2006.
- MALDONADO, E.; TORRES, F. R.; MARTINEZ, M.; CASTORENA, A. P. 18 acetoxywithanolides from *Physalis chenopodifolia*. **Planta Med.**, v. 70, n. 1, p. 59-64, Jan. 2004.
- MALTEN, K.E. Thoughts on irritant contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, v. 7, p. 435–438, 1981.
- MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. The conversion stage of skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 11, n. 12, p. 2085-2092, 1990.
- MCFADDEN, J. P.; BASKETTER, D. A. Contact allergy, irritancy and 'danger'. **Contact Dermatitis**, v. 42, n. 3, p. 123-127, 2000.

- MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 559, p. 227–235, 2007.
- MEURER, R.; OPAS, E. E.; HUMES, J. L. Effects of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on inflammation associated with oxazolone-induced delayed hypersensitivity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, p. 3511-3514, 1988.
- MEYER, S.; VOGT, T.; LANSTHALER, M.; KARRER, S. Use of phytopharmaceutical agents in dermatology. Indications, therapeutic approaches and side effects. **Hautarzt**, v. 56, n. 5, p. 483-499, 2005.
- MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 2000.
- MIZUTANI, H.; BLACK, R.; KUPPER, T. S. Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 1966-1971, 1991.
- MORTZ, C. G.; LAURITSEN, J. M.; BINDSLEV-JENSEN, C.; ANDERSEN, K. E. Prevalence of atopic dermatitis, asthma, allergic rhinitis, and hand and contact dermatitis in adolescents. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis. **Br. J. Dermatol.**, v. 144, n. 3, p. 523-532, 2001.
- MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumors: Old stories and new ideas. **Eur. J. Cancer**, v. 42, p. 735-744, 2006.
- MURAKAWA M.; YAMAOKA K.; TANAKA Y.; FUKADA Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p.1331-1336, 2006.
- NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAL, K.;HYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: defferential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 35, n. 9, p. 997-1007, 2003.
- NETHERCOTT, J. Positive predictive accuracy of patch tests. **Immun. Allergy Clin. N. Am.**, v. 9, p. 549–553, 1989.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.
- NICKOLOFF, B. J.; NESTLÉ, F. O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **J. Clin. Invest.**, v.13, p. 1664-1675, 2004.
- NICOLAOU, N.; JOHNSTON, G. A. The use of complementary medicine by patients referred to a contact dermatitis clinic. **Contact Dermatitis**, v. 51, p. 30-33, 2004.

- NORRIS, D. A. Structure and function of the skin. In: GOLDMAN, L.; ANSIELLO, D. **Textbook of medicine**. 22nd ed., p. 2444-2446, 2004.
- OBERYSZYN, T. M.; SABOURIN, C. L.; BIJUR, G. N.; OBERYSZYN, A. S.; BOROS, L. G.; ROBERTSON, F. M. Interleukin-1 alpha gene expression and localization of interleukin-1 alpha protein during tumor promotion. **Mol. Carcinog.**, v. 7, n. 4, p. 238-248, 1993.
- OKIMASU, E.; MOROMIZATO, Y.; WATANABE, S. Inhibition of phospholipase A2 and platelet aggregation by glycyrrhizin an antiinflammation drug. **Acta Med. Okayama**, v. 37, p. 385-391, 1983.
- PAJONK, F.; RIEDISSER, A.; HENKE, M.; MCBRIDE, W.; FIEBICH, B. The effects of tea extracts on proinflammatory signaling. **BMC Med.**, v. 1, n. 4, p. 28, 2006.
- PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 17, p. 321-328, 2006.
- PERALTA, J. G.; LLESUY, S.; EVELSON, P.; CARRERAS, M. C.; FLECHA, B. G.; PODEROSO, J. J. Oxidative stress in skeletal muscle during sepsis in rats. **Circ. Shock**, v. 39, n. 2, p. 153-159, 1993.
- PETERSEN, T. K. In vivo Pharmacological Disease Models for Psoriasis and Atopic Dermatitis in Drug Discovery. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 99, p. 104-115, 2006.
- PIGUET, P. F.; GRAU, G. E.; ALLET, B.; VASSALLI, P. Tumor necrosis factor / cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs disease. **J. Exp. Med.**, v. 166, p. 1280, 1987.
- PIGUET, P. F.; GRAU, G. E.; HAUSER, C.; VASSALI, P. Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 673-679, 1991.
- POBER, J. S.; SESSA, W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 10, p. 803-815, 2007.
- POLLEY, H. F. Slocumb CH. Behind the scenes with cortisone and ACTH. **Mayo Clin. Proc.**, v. 51, n. 8, p. 471-477, 1976.
- PÓNYAI, G.; TEMESVÁRI, E.; KÁRPÁTI, S. Adulthood atopic dermatitis: epidemiology, clinical symptoms, provoking and prognostic factors. **Orv. Hetil.**, v. 148, p. 21-26, 2007.
- PROTTEY, C.; HARTOP, P. J.; FERGUSON, T. F. M. The effect of soap upon certain aspects of skin biochemistry. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 24, p. 473-492, 1972.
- PUIGNERO, V.; QUERALT, J. Effect of topically applied cyclooxygenase-2- selective inhibitors on arachidonic acid and tetraacnoylphorbol acetate- induced dermal inflammation in the mouse. **Inflammation**, v. 21, p. 431-442, 1997.
- QUEILLE-ROUSSEL, C.; DUTEIL, L.; PADILLA J. M.; PONCET, M.; CZERNIELEWSKI, J. Objective assessment of topical anti-inflammatory drug activity on experimentally induced

nickel contact dermatitis: comparison between visual scoring, colorimetry, laser Doppler velocimetry, and transepidermal water loss. **Skin Pharmacol.**, v. 3, p. 248–255, 1990.

QIU, L.; ZHAO, F.; JIANG, Z. H.; CHEN, L. X.; ZHAO, Q.; LIU, H. X.; YAO, X. S.; QIU, F. Steroids and Flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and Their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 642–646, 2008.

RAICK, A. N.; THUMM, K.; CHIVERS, B. R. Early effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on the incorporation of tritiated precursor into DNA and the thickness of the interfollicular epidermis, and their relation to tumor promotion in mouse skin. **Cancer Res.**, v. 32, n. 7, p. 1562–1568, 1972.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

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

RAUH, L. K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos**. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; URIBURU, L.; MÁÑEZ, S.; CERDÁ, M.; DE LA FUENTE, J. R.; RÍOS, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sci.**, v. 66, n. 26, p. 2509–2518, 2000.

RICHARDSON, J.; SMITH, J. E.; MCINTYRE, M.; THOMAS, R.; PILKINGTON, K. Aloe vera for preventing radiation-induced skin reactions: a systematic literaturereview. **Clin. Oncol. (R Coll Radiol)**, v. 17, n. 6, p. 478–484, 2005.

ROBERT, C.; KUPPER, T. S. Inflammatory skin diseases, Tcells and immune surveillance. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, p. 1817–1828, 1999.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia: texto e atlas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica Panamericana, 1993.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, L. H.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T. J. Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 7, n. 11, p. 2343–2352, Nov. 1999.

SAINT-MEZARD, P.; ROSIERES, A.; KRASTEVA, M.; BERARD, F.; DUBOIS, B.; KAISERLIAN, D; et al. Allergic contact dermatitis. **Eur. J. Dermatol.**, v. 14, p. 284– 295, 2004.

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

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Eczemas. In: _____. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 1998.

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

SANTAMARIA BABI, L. F.; PICKER, L. J.; PEREZ SOLER, M. T.; DRZIMALLA, K.; FLOHR, P.; BLASER, K.; HAUSER, C. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skinselective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 5, p.1935-1940, 1995.

SCHAERLI, P.; BRITSCHGI, M.; KELLER, M.; STEINER, U. C.; STEINMANN, L. S.; MOSER, B.; PICHLER, W. J. Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. **J. Immunol.**, v. 173, p. 2151-2158, 2004.

SCHEINBERG, M. A. Terapêutica biológica nas artrites inflamatórias. **Einstein**, v. 6, p. 175-177, 2008.

SCHOEPE, S.; SCHACKE, H.; MAY, E.; ASADULLAH, K. Glucocorticoid therapyinduced skin atrophy. **Exp. Dermatol.**, v. 15 , p. 406-420, 2006.

SCHOLZ, K.; FURSTENBERGER, G.; MULLER-DECKER, K.; MARKS, F. Differential expression os prostaglandin-H synthase isoenzymes in normal and activated keratinocytes in vivo and in vitro. **Biochem. J.**, v. 309, p. 263-269, 1995.

SCHRAMM, R.; THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation inhibitory mechanisms of glucocorticoids. **Inflamm. Res.**, v. 53, n. 12, p. 644-652, 2004.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **J. Clin. Invest.**, v.116, n. 5, p. 1150-1158, 2006.

SERHAN, N. C.; SAVIL, J. Resolution of Inflammation: The beginning programs the end. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 12, p.1191-1197, 2005.

SHAEFER, H.; REDELMEIER, T. E. **Skin Barrier: principles of percutaneous absorption**. Berna: Karger, 1996.

SHEEHAN, M. P.; ATHERTON, D. J. One year follow-up of children tested with Chinese medicinal herbs for atopic eczema. **Br. J. Dermatol.**, v. 130, p. 488-493, 1994.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice Res. Clin. Anesthesiol.**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHEU, M. Y.; FOWLER, A. J.; KAO, J.; SCHMUTH, M.; SCHOONJANS, K.; AUWERX, J.; FLUHR, J. W.; MAN, M. Q.; ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. **J. Invest. Dermatol.**, v. 118, n. 1, p. 94-101, 2002.

SHIN, Y.; BAE, E.; KIM, S.; LEE, Y.; KIM, D. Effect of ginsenoside Rb1 and compound in chronic oxazolone-induced mouse demartitis. **Int. Immunopharmacol.**, v. 5, p. 1183-1191, 2005.

SCHOLZ, K.; FURSTENBERGER, G.; MULLER-DECKER, K.; MARKS, F. Differential expression of prostaglandin-H synthase isoenzymes in normal and activated keratinocytes in vivo and in vitro. **Biochem. J.**, v. 309, p. 263-269, 1995.

SKINNER, R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. **J. Cutan. Med. Surg.**, v. 8, n. 3, p. 22-31, 2005.

SIMMONS, D. L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug Discov. Today**, v.11, n. 5/6, p. 210-219, 2006.

SIMÕES, O. C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2002.

SIMPSON, E. L.; BASCO, M.; HANIFIN, J. A cross-sectional survey of complementary and alternative medicine use in patients with atopic dermatitis. **Am. J. Contact Dermat.**, v. 14, p. 144-147, 2003.

SIMPSON, P. J.; FANTONE, J. C.; MICKELSON, J. K.; GALLAGHER, K. P.; LUCCHESI, B. R. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. **Circ. Res.**, v. 63, n. 6, p. 1070-1079, 1988.

SMITH, C. New approaches to topical therapy. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, p. 567-574, 2000.

SMITH, H. R.; BASKETTER, D. A.; MCFADDEN, J. P. Irritant dermatitis, irritancy and its role in allergic contact dermatitis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 27, p. 138-146, 2002.

SOARES, M. B.; BRUSTOLIM D.; SANTOS, L. A.; BELLINTANI, M. C.; PAIVA, F. P.; RIBEIRO, Y. M.; TOMASSINI, T. C.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, p. 408-414, 2006.

SOARES, M. B.; BELLINTANI, M. C.; RIBEIRO, I. V.; TOMASSINI, T. C. B.; SANTOS, R. R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *P. angulata* Lin. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 459, n. 1, p.107-112, 2003.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.

SONG, I. H.; GOLD, R.; STRAUB, R. H. New Glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate! **J. Rheumatol.**, v. 32, n. 7, p. 1199-1207, 2005.

SPERGEL, J. M.; MIZOGUCHI, E.; OETTGEN, H.; BHAN, A.K.; GEHA, R.S. Role of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. **J. Clin. Invest.**, v. 103, p. 1103-1111, 1999.

SILVA, C. S.; CARVALHO, J. C. T. Inflamação. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmedd, 2004.

SILVA, M. T.; SIMAS, S. M.; BATISTA, T. G.; CARDARELLI, P.; TOMASSINI, T. C.; Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 779-782, 2005.

SITTART, J. A. S.; PIRES, M. C. Eczemas. In: _____. **Dermatologia para o clínico**. 2. ed. São Paulo: Lemos Editora, 1998.

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

STARLEY, I. F.; MOHAMMED, P.; SCHNEIDER, G.; BICKLER, S. W. The treatment of paediatric burns using topical papaya. **Burns**, v.25, n.7, p. 636-639, 1999.

SU, B.; MISICO, R.; PARK, E. J.; SANTARSIERO, B. D. Isolation and characterization of bioactive of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. **Tetrahedron**, v. 58, n. 17, p. 3453-3466, 2002.

SUGINO, K.; IMOKAWA, G.; MAIBACH, H. I. Ethnic difference of stratum corneum lipid in relation to stratum corneum function. **J. Invest. Dermatol.**, v. 100, p. 597, 1993.

SUR, R.; MARTIN, K.; LIEBEL, F.; LYTE, P.; SHAPIRO, S.; SOUTHALL, M. Anti-inflammatory activity of parthenolide-depleted Feverfew (*Tanacetum parthenium*). **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 42-49, 2009.

TAMURA, T.; MATSUBARA, M.; TAKADA, C.; HASEGAWA KSUZUKI, K.; OHMORI, K.; KARASAWA, A. effects of alopataidine hydrochloride an antihistamine drug on skin inflammation induced by repeated topical application of oxazolone in mice. **Br. J. Dermatol.**, v. 151, n. 6, p. 1133-1142, 2004.

TAN, J. K.; APHALE, A.; MALAVIYA, R.; SUN, Y.; GOTTLIEB, A. B. Mechanisms of action of etanercept in psoriasis. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, v. 12, p. 38-45, 2007.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis*-Uma revisão sobre vitaesteróides. **Quím. Nova**, v. 23, n. 1, p.47-57, 2000

TUCKERMANN, J. P.; KLEIMAN, A.; MORIGGI, R.; SPANBROEK, R.; NEUMANN, A.; ILLING, A.; CLAUSEN, B.E.; STRIDE, B.; FORSTER, I.; HABENICHT, A. J. R.; REICHARDT, H. M.; TRONCHE, F.; SCHMID, W.; SCHTZ, G. Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p.1381-1390, 2007.

TYLER, V. E. **Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals**. New York, NY: Pharmaceutical Products Press, 1994.

UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **J. Dermatol. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 29-38, 2000.

VANDENBERGUE, I.; CRÉANCIER, L.; VISPÉ, S.; ANNÉREAU, J. P.; BARRET, J. M.; POU, Y. I.; SAMSON, A.; AUSSAGUES, Y.; MASSIOT, G.; AUSSEIL, F.; BAILLY, C.; KRUCZYNSKI, A. Physalin B, a novel inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, triggers NOXA-associated apoptosis. **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, n. 4, p. 453-462, 2008.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Am. J. Med.**, v. 104, n. 3A, p. 2S-8S, 1998.

VASUNIA, K. B.; MILLER, M. L.; PUGA, A.; BAXTER, C. S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is expressed in mouse skin in response to tumorpromoting agents and modulates dermal inflammation and epidermal dark cell numbers. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 4, p. 653-660, 1994.

VENDER, R. B. Alternative treatments for atopic dermatitis: a selected review. **Skin Therapy Lett.**, v.7, p. 1-5, 2002.

VERAS, M. L.; BEZERRA, M. Z. B.; LEMOS, T.; LIN, G.; UCHOA, D. E. A.; BRAZ FILHO, R.; CHAI, H.B.; CORDEL, G. A.; PESSOA, O. D. Cytotoxic Withaphysalins from the Leaves of *Acnistus arborescens*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 4, p. 710-713, 2004

VIEIRA, A. T.; PINHO, V.; LEPSCH, L. B.; SCAVONE, C.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T.; ROBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, p. 244-251, 2005.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 239 -254, 1996.

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L.; FREED, I.; HOWELL, B. G.; SHAHID, S.; SHIVJI, G. M.; MAK, T. W.; SAUDER, D. N. CD4 + Th1 and CD8 + type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **J. Immunol.**, v. 165, p. 6783-6790, 2000.

WANG, H. Q.; KIM, M. P.; TIANO, H. F.; LANGENBACH, R.; SMART, R. C. Protein kinase C- alpha Coordinately regulates cytosolic phospholipase A (2) activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes. **Mol. Pharmacol.**, v. 59, p. 860-866, 2001.

WEBB, E. F.; TZIMAS, M. N.; NEWSHOLME, S. J.; GRISWOLD, D. E. Intralesional cytokines in chronic oxazolone-induced contact sensitivity suggest roles for tumor necrosis factor alpha and interleukin-4. **J. Invest. Dermatol.**, v. 111, n. 1, p. 86-92, 1998.

WEE, S. S.; SHIN, Y. W.; BAE, E. A.; KIM, D. H. Effect of chunghyuldan in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 6, p. 1079-1082, 2005.

WEIGAND, D.A.; HAIGOOD, C.; GAYLOR, J. R. Cell layers and density of negro and Caucasian stratum corneum. **J. Invest. Dermatol.**, v. 62, p. 563-568, 1974.

- WELDON, D. What lies beneath the surface of the itch in adults? **Allergy Asthma Proc.**, v. 28, n. 2, p. 153-162, mar./abr. 2007.
- WERTH, V. P. Principles of therapy. In: GOLDMAN, L.; ANSIELLO, D. **Textbook of medicine**. 22nd ed. Cidade: editor, 206. p. 2462.
- WERZ, O.; KLEMM J.; SAMUELSSON B.; RADMARK O. phorbol ester up-regulates capacities of nuclear translocation and human polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 97, p. 2487-2495, 2001.
- WICHTL, M. **Herbal drugs and phytopharmaceuticals**. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc, 1994.
- WIGGER-ALBERTI, W.; ELSNER, P. Contact dermatitis due to irritation. In: KANERVA, L.; ELSNER, P.; WAHLBERG, J. E.; MAIBACH, H. (Ed.). **Handbook of occupational dermatology**. New York: Springer-Verlag, 2000. p. 99– 110.
- WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T.S. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sci.**, v. 58, n. 18, p. 1485-1507, 1996.
- WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M. I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 102, n. 6, p. 915-922, 1994.
- WRIGHT, A. P.; ZILLIACUS, J.; MCEWAN, I. J.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; ALMOF, T.; CARLSTEDT-DUKE, J. Structure and function of the glucocorticoid receptor. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 47, n. 1/6, p. 11-19, 1993.
- WU, S. J.; NG, L.- T.; CHEN, C. H.; LIN, D. L.; WANG, S. S.; LIN, C. C. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 Cells. **Life Sci.**, v. 74, n. 17, p. 2061-2073, 2004a.
- WU, S. J.; LEAN-TEIK, N. G.; DOUNG-LIANG, L.; SHAN-NEY, H.; SHYH-SHYAN, W.; CHUN-CHING, L. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. **Cancer Lett.**, v.215, n. 2, p. 199-208, 2004b.
- YOUNG, J. M.; DE YOUNG, I. M. **Pharmacological methods in the control of inflammation**. New York: J. Alan R. Liss, 2000.
- YOUNG, J. M.; SPIRES, D. A.; BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLRON, S. J.; DE YOUNG, L. M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **J. Invest. Dermatol.**, v. 82, p. 367- 371, 1984.
- YOUNG, J. M.; WAGNER, B.; SPIRES, D. A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear oedema. **J. Invest. Dermatol.**, v. 80, p. 48-52, 1983.
- YUE–ZHONG, S. H. U. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 1053–1071, 1998.

ZHANG, C. F.; WANG, D. S.; LING, X. Z. Diacetylmethystoidin A protects isolated working rat heart against myocard reperfusion injury. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**, v. 17, p. 245-248, 1996.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)