

Maria Cecília Cattai Anauate

Efeito dos extratos de *Harpagophytum procumbens* (garra-do-diabo) e suas frações na atividade da COX-1 e COX-2 e na produção de NO em sangue total

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Reumatologia
Orientadora: Profa. Dra. Suzana Beatriz
Veríssimo de Mello

São Paulo
2007

“QUANDO UMA CRIATURA HUMANA DESPERTA PARA UM GRANDE SONHO E SOBRE ELE LANÇA TODA A FORÇA DE SUA ALMA, TODO UNIVERSO CONSPIRA A SEU FAVOR”.

Goethe

UM AGRADECIMENTO ESPECIAL A MINHA AMIGA, MÁRCIA.
POR SUA ORIENTAÇÃO, DEDICAÇÃO E DISPONIBILIDADE EM
CONSPIRAR AO MEU FAVOR NA REALIZAÇÃO DESSE SONHO.

A MINHA FAMÍLIA MEUS AGRADECIMENTOS.
AO MEU MARIDO, GILBERTO E MEUS FILHOS, RAFAEL E MARINA
OBRIGADA PELO APOIO INCONDICIONAL NESSE PROJETO DE
VIDA.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra Suzana Beatriz Veríssimo de Mello, minha orientadora, pelo acompanhamento, dedicação e orientação dos meus estudos.

À Prof^a Dra Luce Maria Brandão Torres, pesquisadora do Instituto de Botânica de São Paulo, por sua importante participação no preparo do material vegetal utilizado nos ensaios *in vitro*.

À Prof^a Dra Márcia Regina Braga, pesquisadora e chefe do Departamento de Fisiologia do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo incentivo, orientação, e por sua amizade e apoio na realização desse projeto.

À Prof^a Dra Elaine Cardoso Monteiro Lopes, pesquisadora do Departamento de Fisiologia do Instituto de Botânica de São Paulo, pela ajuda e especial participação.

À Maria Aurora Gomes da Silva e à Maria de Fátima Almeida pelo carinho e pelo ensino dos protocolos experimentais e pela presteza no auxílio da realização dos procedimentos.

A farmácia de manipulação, Pró-fórmula situada à Alameda do Jurupis, nº 1278, Moema por ter cedido gentilmente os extratos bruto hidro-alcoólico do *Harpagophytum procumbens* com certificado de atividade biológica e de procedência.

À Tatiana Marques Ferreira da Rocha, aluna da Prof^a Luce do Instituto de Botânica de São Paulo pela ajuda na preparação e separação do material vegetal.

À Maria de Fátima Correia da Silva pela ótima assistência de secretaria.

SUMÁRIO

Lista de siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Osteoartrite.....	1
1.2 Osteoartrite de coluna lombar.....	2
1.2.1 Fisiopatologia da dor lombar.....	3
1.3 <i>Harpagophytum procumbens</i> (Família Pedaliaceae)	9
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Material vegetal.....	16
3.2 Fracionamento do extrato	16
3.3 Ensaio em sangue total da atividade da COX-1 e COX-2	23
3.4 Ensaio <i>in vitro</i>	24
3.4.1 Avaliação da atividade da COX-1.....	24
3.4.2 Avaliação da atividade da COX-2.....	24
3.4.3 Quantificação de Tromboxano B ₂ e Prostaglandina E ₂	24
3.4.4 Ensaio <i>in vitro</i> – efeitos do extrato bruto da garra-do-diabo	25
3.4.5 Ensaio <i>in vitro</i> – efeitos das diferentes frações da garra-do-diabo	26
3.5 Análise dos metabólitos do NO - NO ₂ ⁻ e NO ₃ ⁻	26
3.6 Seleção das pacientes.....	27
3.6.1 Avaliação da flexibilidade da coluna lombar e questionários	29
A - Medida da distância mão chão	29

B - Teste de Thomas.....	29
C – Questionário sobre a avaliação de saúde.....	30
D – Questionário de incapacidade Roland Morris.....	30
3.6.2 Exames de Imagem.....	30
3.7 Ensaio <i>ex vivo</i>	31
3.8 Análises estatísticas.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Ensaio clínico.....	32
4.2 Ensaio <i>in vitro</i>	34
4.2.1 Ensaio <i>in vitro</i> – efeito do extrato bruto da garra-do-diabo	34
4.3 Ensaio <i>ex vivo</i> para avaliação da atividade da COX-1 e COX- 2 e produção de NO em sangue total	35
4.4 Efeitos das diferentes frações do extrato da garra-do-diabo na atividade da COX-1 e COX-2 e produção de NO	37
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES.....	46
7. ANEXOS.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE SIGLAS

AA = ácido araquidônico

AINH = antiinflamatórias não hormonais

AR = artrite reumatóide

CCDC = cromatografia de camada delgada comparativa

CCDP = cromatografia de camada delgada preparativa

CHCl₃: MeOH = clorofórmio : metanol

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

cNOS = óxido nítrico sintase constitutiva

CO₂ = gás carbônico

COX-1 = ciclooxigenase 1

COX-2 = ciclooxigenase 2

DMC = distância mão chão

EVA = escala visual analógica

FR = fator reumatóide

HAQ = questionário de saúde

HPLC = *high performance liquid chromatography*

¹ HRMN = ressonância nuclear magnética de hidrogênio

IGF = fator de crescimento I similar à insulina

IC₅₀ = concentração inibitória

IL = interleucina

IL-1 β = interleucina 1 β

IL-1 ra = receptor anti-interleucina 1

iNOS = óxido nítrico sintase induzida

INSS = Instituto Nacional do Sistema de Saúde

LPS = lipopolissacarídeo

LOX = lipooxigenase

LT = leucotrieno

MEC = matriz extracelular
MMP = metaloproteinase da matriz
M/V = massa/ volume
NF- κ B = fator nuclear kb
NO = óxido nítrico
NO₂⁻ = nitrito
NO₃⁻ = nitrato
NOS = óxido nítrico sintase
OA = osteoartrite
O₂⁻ = anion superóxido
ONOO⁻ = anion peróxinitrato
PCR = proteína C reativa
PGs = prostaglandinas
PGE₂ = prostaglandina E₂
PGH₂ = prostaglandina endoperóxido H₂
PGI₂ = prostaciclina
PMN = polimorfonuclear
Rfs = fator de referência
RL = radicais livres
RM = questionário de incapacidade Roland Morris
RNAm = ribossoma nuclear mensageiro
RNM = ressonância nuclear magnético
RPM = rotação por minuto
TIMP = inibidor tecidual de metaloproteinase
TGF- β = fator de transformador de crescimento
TMS = tetrametilsilano
TNF- α = fator de necrose tumoral – alfa
TR = tempo de retenção
TX = tromboxano
TXA₂ = tromboxano A₂
TXB₂ = tromboxano B₂

UV = ultravioleta

VHS = velocidade de hemossedimentação

WOMAC = *Western Ontário and MacMaster Universities Osteoarthritis Index*

RESUMO

Anauate MCC. Efeitos dos extratos de *Harpagophytum procumbens* (garra-do-diabo) e suas frações na atividade da COX-1 e COX-2 e produção de NO em sangue total [tese]. São Paulo; Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

OBJETIVO: O presente estudo avaliou o efeito dos extratos de *H. procumbens* e suas frações na atividade da COX-1 e COX-2 e produção de NO em ensaio de sangue total de voluntários sadios e pacientes com OA. **MÉTODOS:** A atividade da COX-1 foi determinada através da produção de TxB_2 por plaquetas e da COX-2 pela produção de PGE_2 por monócitos estimulados por LPS. A produção de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ foi determinada por reação de Griess. Os ensaios *in vitro* foram realizados por incubação do extrato do extrato de *H. procumbens* e frações em sangue total. Os controles inibidores da atividade da COX-1 e COX-2 foram indometacina e etoricoxibe. A atividade enzimática das COXs e produção de NO foram avaliadas antes e após o tratamento com garra-do-diabo em pacientes com OA de coluna lombar. **RESULTADOS:** O tratamento com garra-do-diabo foi eficaz clinicamente e aumentou a atividade da COX-1 e COX-2 basal sem LPS. O extrato bruto do *H. procumbens* não alterou a atividade das COX. Entretanto, o harpagosideo inibiu a atividade da COX-1, COX-2 e a produção de NO. **CONCLUSÃO:** A garra-do-diabo mostrou-se eficaz no tratamento de pacientes com OA de coluna lombar. O harpagosideo deve ser alvo estudos específicos.

Descritores: 1.Osteoartrite 2.Ciclooxigenase 1 3.Ciclooxigenase 2 4.Óxido nítrico 5.*Harpagophytum procumbens* 6. Iridóides/ uso terapêutico.

SUMMARY

Anauate MCC. EFFECTS OF *HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS* (DEVIL'S CLAW) EXTRACTS AND ITS FRACTIONS ON COX-1 AND COX-2 ACTIVITY AND NITRIC OXIDE PRODUCTION IN WHOLE BLOOD

OBJECTIVE: The present study evaluated the effect of *H. procumbens* extracts and its fractions on COX-1 and COX-2 activity and NO production in whole blood assays of volunteers and OA patients. **METHODS:** The COX-1 and COX-2 activity was quantified as platelet TXB₂ production in blood clotting and as PGE₂ production in heparinized LPS-stimulated whole blood, respectively. Total NO₂⁻/NO₃⁻ was determined by Griess reaction. *In vitro* assays were performed through incubation of the extract and fractions with whole blood from volunteers. Controls of the inhibition of COX-1 and COX-2 activity were indomethacin and etoricoxib. Before and after treating OA lumbar spine patients with devil's claw the COX-1 and COX-2 activity and NO production were evaluated in their whole blood. **RESULTS:** The treatment promoted clinical improvement and increase in the activity of COX-1 and basal COX-2, without LPS. The crude extract did not affect the activity of both enzymes. However, harpagoside inhibited COX-1 and COX-2 activity and NO production. **CONCLUSION:** Devil's claw promoted clinical improvement of OA patients and harpagoside must be focus of specific studies.

Descriptors: 1. Osteoarthritis. 2. Cyclooxygenase 1. 3. Cyclooxygenase 2. 4. Nitric oxide. 5. *Harpagophytum procumbens*. 6. Iridoids /therapeutic use.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

