

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 NO_2^-/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.

1.INTRODUÇÃO

1.1 OSTEOARTRITE

A Osteoartrite (OA) pode ser definida como um grupo heterogêneo de alterações na cartilagem articular e no osso subcondral. Apesar de diversas etiologias, tem características clínicas, radiológicas, biológicas e patológicas semelhantes (Brandt et al., 2003). É a doença articular mais comum e no Brasil tem prevalência de cerca de 20% e, de acordo com os dados do INSS, é responsável por 7,5% de todos os afastamentos do trabalho. As mulheres apresentam uma suscetibilidade maior ao desenvolvimento da doença e as mulheres negras são as mais propensas (Seda et al., 2001).

O quadro inicial da OA é dinâmico, marcado pela alteração no equilíbrio entre a reparação da cartilagem articular e do osso subcondral e a sua degradação. Os fatores de crescimento IGF-1 e TGF- β , que são citocinas anabólicas, estimulam a síntese de proteoglicanos e colágeno, que desempenham papel fundamental na tentativa de reparação da matriz cartilaginosa e esse processo leva ao espessamento cartilaginoso. A secreção das citocinas inflamatórias (IL-1 e TNF- α), bem como da citocina modulatória (IL-6), pelos condrócitos parece ser a principal responsável pelo aumento da produção das metaloproteinases matriciais (MMPs), de seus ativadores e do inibidor tecidual das metaloproteinases (TIPMs) (Figura 1). Com o aumento da liberação dessas enzimas, ocorrem alterações nas propriedades fisiológicas da cartilagem (Fernandes et al., 2002). Com a evolução do processo, a superfície da cartilagem torna-se áspera e/ou desgastada com a formação de fissuras (fibrilação) e erosões, com exposição do osso subcondral. Após o desgaste da cartilagem, ocorre uma neoformação óssea e o resultado final é a alteração da função articular. A inflamação é um elemento fundamental na fisiopatologia da OA, pois acelera o catabolismo da cartilagem (Berenbaum et al., 2001).

O quadro clínico é geralmente insidioso e caracterizado por dor articular protocinética (antes da movimentação), acompanhada de aumento da sensibilidade articular e limitação do movimento (Long et al., 2001).

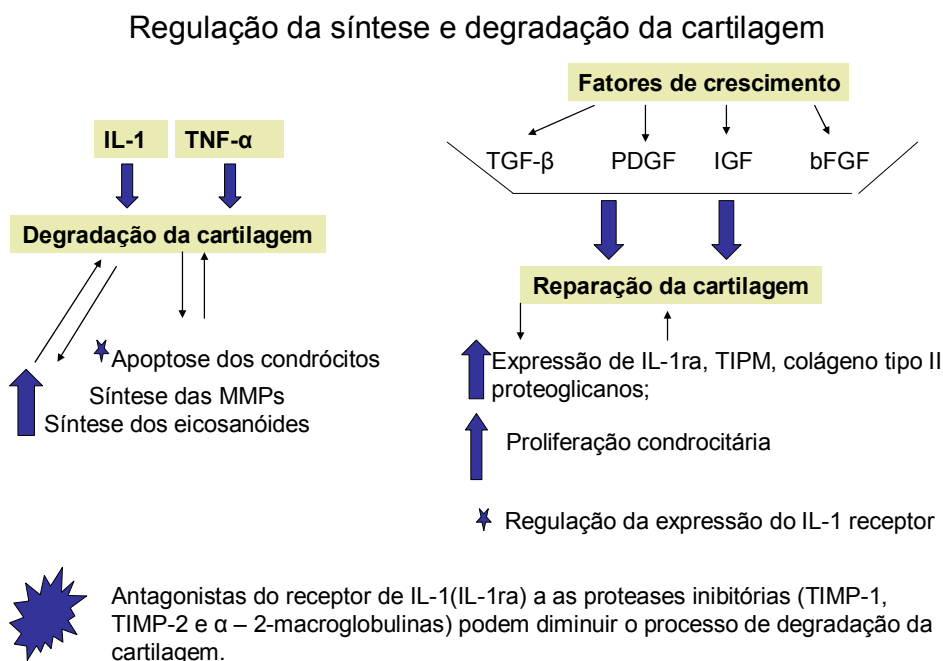


Figura 1 - Processo de remodelação da cartilagem. Na OA existe aumento das enzimas degradativas, com desequilíbrio que leva ao desarranjo do colágeno e dos proteoglicanos da matriz.

1.2 OA de coluna lombar

Dor lombar ou lombalgia pode ser definida como dor, tensão muscular ou sensibilidade localizada abaixo da margem das costelas e acima da borda inferior dos glúteos com ou sem irradiação da dor para a perna. Embora o episódio agudo de dor lombar seja freqüente e permaneça geralmente menos que três meses, os episódios recorrentes são responsáveis pela incapacidade física e alterações psicológicas (Chrubasik^a et al., 2003). A OA é a principal causa de incapacidade física nos países industrializados, sendo a segunda causa de procura por assistência médica entre as doenças crônicas. Os fatores de risco para ocorrência de dor lombar estão

relacionados à idade, sexo, tabagismo, etc. O estresse, a dor, o humor depressivo e as funções cognitivas são os fatores psicossociais que influenciam o aparecimento da dor (Chantre et al., 2000).

1.2.1 Fisiopatologia da dor lombar

As fontes potenciais de lombalgia incluem os discos intervertebrais, articulações das facetas, vértebras, estruturas neurais, músculos, ligamentos e fáscia. Os mecanismos e as vias pelas quais os processos degenerativos do disco intervertebral levam ao quadro doloroso ainda não estão bem compreendidos (Biyani et al., 2004).

O disco intervertebral é composto de tecido fibrocartilaginoso que apresenta propriedades mecânicas de absorção e dissipação das cargas da coluna lombar, permitindo o seu movimento suave. Possui estrutura única composta por um núcleo pulposo gelatinoso interno circundado por um anulo fibroso externo. No processo de envelhecimento ocorre uma desidratação do núcleo pulposo com diminuição do número de células da matriz cartilaginosa extracelular (MEC) e da concentração dos proteoglicanos. A presença de co-morbidade tais como diabetes, doenças vasculares e o fumo podem acelerar o processo degenerativo (Biyani et al., 2004).

A mudança na estrutura do disco altera sua resposta à sobrecarga e o alinhamento da coluna vertebral em repouso, transformando as articulações facetárias, os ligamentos e os músculos para-vertebrais em fontes adicionais de dor. As mudanças do disco na forma e no volume ocorrem com o envelhecimento a partir dos 50 anos (Biyani et al., 2004) (Figura 2).

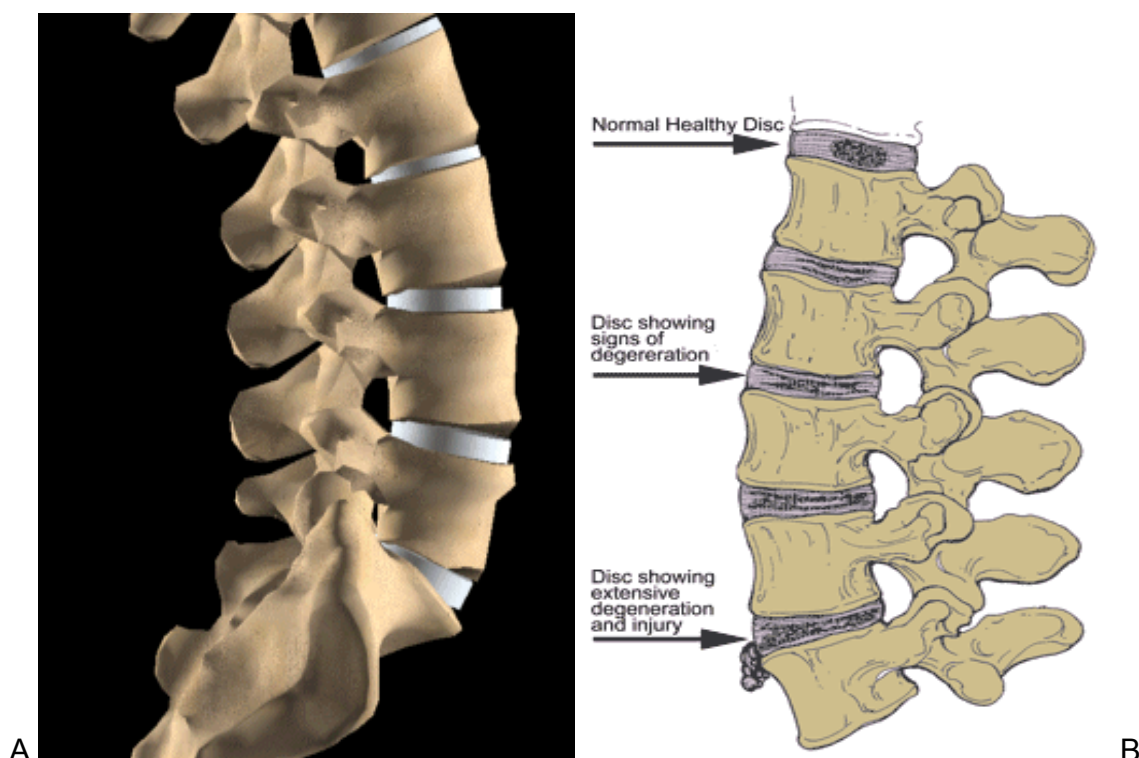


Figura 2 - Coluna lombar com aspecto normal (A) e com mudanças no volume e na forma do disco intervertebral (B), sinais de degeneração que ocorrem quase universalmente com o envelhecimento.

Os eventos bioquímicos que ocorrem com a degeneração do disco intervertebral, em particular o papel dos mediadores químicos envolvidos na regulação do processo inflamatório, como a interleucina -1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), tromboxano A2 (TxA2) e óxido nítrico (NO), têm sido apontados como fontes geradoras de dor na região lombar (Takayashi et al., 1996) (Figura 3).

A ação da IL-1 está relacionada ao aumento dos fatores de catabolismo nos condrócitos, como as MMPs e o NO, levando a um dano da MEC. Através da estimulação da IL-1, ocorre aumento da expressão das formas indutíveis das enzimas óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase 2 (COX-2) nos condrócitos (Amin et al., 1999). A participação do NO como mediador na lesão do disco intervertebral e a sua relação com o envelhecimento e a doença degenerativa do disco intervertebral ainda não são totalmente compreendidas. Além disso, o aumento na produção de NO diminui os níveis do inibidor natural da IL-1, o antagonista de receptor IL-1 que é uma citocina

anticatabólica, produzindo aumento ainda maior na concentração dessas citocina no local da inflamação (Solovieva et al., 2004). A compressão mecânica da cartilagem aumenta a produção de COX-2 e PGE₂, através de uma via nitrito dependente (Takayashi et al., 1996).

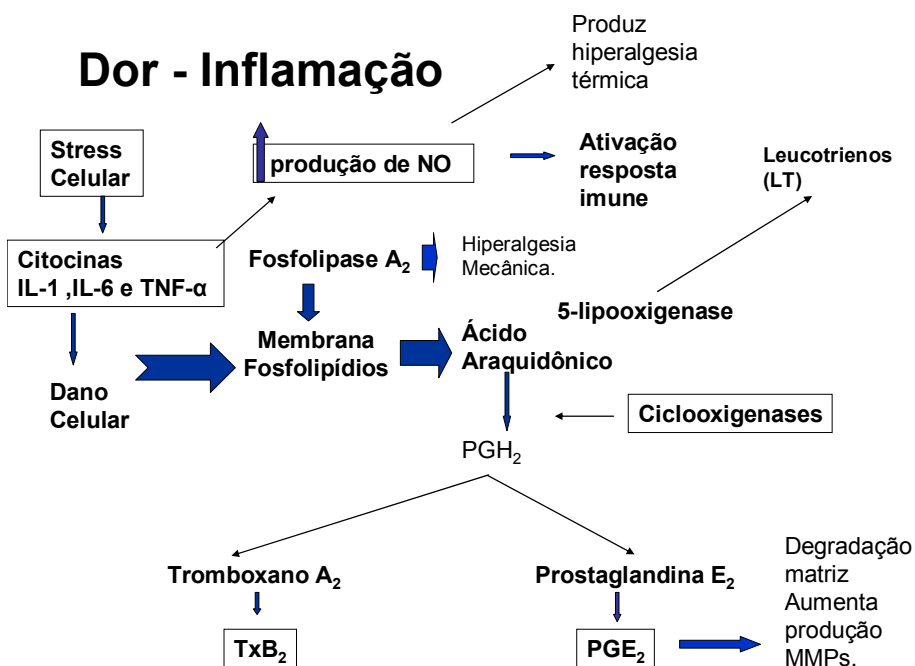


Figura 3 - Relação entre os mediadores químicos responsáveis pela produção de dor e inflamação.

O NO é um radical livre gasoso liberado nos tecidos por duas classes diferentes de enzimas sintases (NOS), uma constitutiva (cNOS) e outra forma enzimática induzida (iNOS), cuja síntese é estimulada por fatores imunológicos, é citosólica e cálcio independente. Essa forma enzimática é produzida por macrófagos, polimorfonucleares (PMN), células endoteliais, hepatócitos, fibroblastos, condrócitos e sinoviócitos (Stefanovic-Racic et al., 1994), com implicações na inflamação. A inibição da produção do NO, principalmente o gerado pela iNOS, pode ter um valor terapêutico particularmente durante a inflamação e o choque séptico (Kim et al., 1999). O NO é capaz de reagir rapidamente com o ânion superóxido (O_2^-) e essa reação é capaz de gerar outros radicais destrutivos. O peróxinitrato ($ONOO^-$) em especial, que quando

protonado pode ser decomposto e formar o radical OH, com grande capacidade oxidante. Sendo assim, a produção dessas espécies reativas de nitrogênio pode estar ligada à destruição tecidual que ocorre durante o processo inflamatório e, particularmente, no dano articular (Su et al., 1996). Adicionalmente, a liberação endógena de NO aumenta a atividade da enzima COX macrofágica que pode resultar na produção de PG pró-inflamatórias (Mello et al., 2000). (Figura 4). A modulação da produção de NO e o conhecimento do seu papel fisiológico e a sua participação nas doenças cardiovasculares e inflamatórias pode ser outra estratégia terapêutica essencial para o desenvolvimento de drogas no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (Kang et al., 1996).

Relações entre a síntese de PGs e de NO

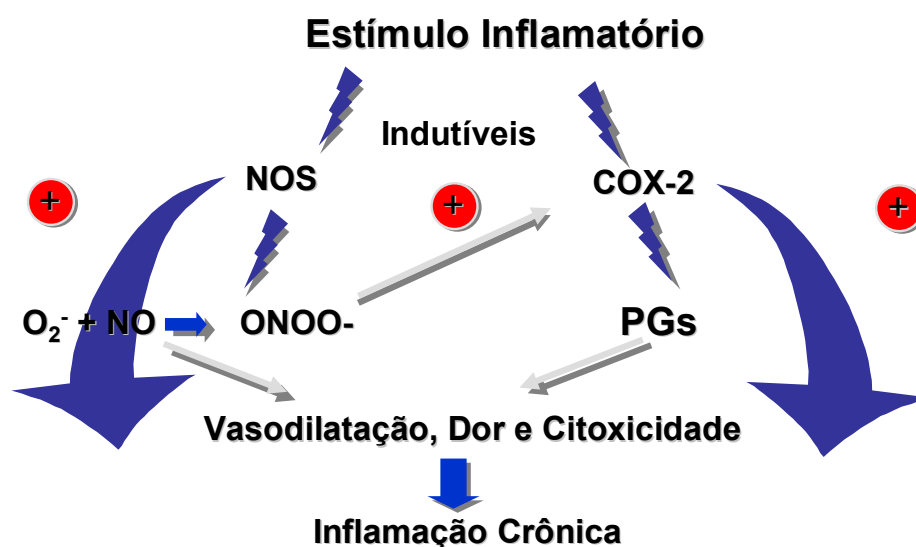


Figura 4 - Relação entre a síntese das prostaglandinas e a produção de NO.

A liberação dos AA por ação da fosfolipase A₂, que hidrolisa fosfolípidios da membrana celular, serve como substrato para duas vias enzimáticas distintas: a via das COXs, que desencadeia a síntese das PGs e dos TXs, e a via das lipooxigenases (LOX), responsável pela síntese dos LT. A síntese das PG inicia-se com a atividade da

COX catalisando a adição do O^2 molecular ao AA para formar PGH_2 . O metabolismo da PGH_2 pelas enzimas isomerases teciduais específicas leva à formação de um produto final biologicamente ativo e localmente específico como as PGE_2 expressa nos sinoviócitos e TxA_2 presente nas plaquetas incluindo também a formação de PGD_2 , PGF_2 e PGI_2 (Penglis et al., 2000).

A COX, enzima chave que catalisa a síntese das PG, também conhecida como PGG/H sintase, possui duas isoformas distintas bastante similares: a COX-1 e COX-2. As duas isoformas são expressas a partir de dois genes diferentes, possuem estrutura protéica primária similar e catalisam essencialmente a mesma reação. A COX-1 foi a primeira a ser caracterizada e é expressa constitutivamente, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins. As PGs que são derivadas da COX-1 têm papel importante na homeostasia e participam da proteção celular da mucosa gástrica, da hemodinâmica renal e trombogênese plaquetária. Por outro lado, as PGs derivadas da COX-2 contribuem de forma mais significativa para os processos de inflamação e malignidade. A COX-2 pode ser induzida na presença de citocinas (IL-1, IL-2 e do $TNF-\alpha$), ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente nas células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos (Penglis et al., 2000). Entretanto, achados mais recentes mostram que a COX-2 pode ser expressa constitutivamente nos vasos renais, na mácula densa cortical, nas células intersticiais dos rins, no ducto coletor e na porção delgada da alça de Henle, na traquéia e no sistema nervoso central. A COX-2 pode também ser mediadora nas funções fisiológicas do endotélio vascular. A liberação da prostaciclina (PGI_2), resultante da metabolização da AA pela COX-2 endotelial, desempenha papel importante no mecanismo de defesa homeostático que promove vasodilatação, fibrinólise e limita a ativação plaquetária. O eicosanoide produzido pela metabolização do AA através da COX-1, o TxA_2 , promove vasoconstrição e agregação plaquetária. É importante salientar que, o envelhecimento pode aumentar a expressão de COX-2 em determinadas áreas, e a conseqüente produção de PG fisiológica passar a ser atributo

dessa enzima, tornando-se, portanto, arriscada a inibição completa da atividade da mesma com drogas de ação seletiva (Salinas et al.,2007) .

Uma terceira isoforma de COX, COX-3, foi recentemente descoberta em cães; é produzida pelo gene da COX-1 e é expressa no córtex cerebral e coração. É seletivamente inibida pelas drogas analgésicas e antitérmicas como o acetaminofen e dipirona e pode ser inibida por certos antiinflamatórios não hormonais (AINHs). Ainda não está claro se os AINHs inibidores seletivos da COX-2 também inibem a COX-3 e se essa inibição pode ser um mecanismo primário central através do quais essas drogas diminuem a dor e, provavelmente, a febre (Chaiamnuay et al., 2006).

A inibição da atividade das COXs, COX-1 e/ou COX-2, é o principal alvo das drogas AINHs impedindo a formação de PG. As inibições não seletivas das isoenzimas COXs levam a efeitos terapêuticos benéficos, mas também a grande número de efeitos adversos. Os efeitos adversos gastrintestinais dos AINHs estão associados à supressão da expressão constitutiva da COX-1, resultando em lesão gástrica, hemorragia e ulceração. Teoricamente, a inibição seletiva da COX-2 nas células inflamatórias poderia ter efeitos favoráveis, mas efetivamente essa inibição nos vasos sanguíneos, cérebro e coração pode ter efeitos deletérios. A inibição seletiva da COX-2 pode levar a um desequilíbrio entre as PGI_2 e TXA_2 que pode ser resumido pelo aumento do risco de eventos cardiovasculares, levando a vasoconstrição e trombose. Sendo assim, todos AINHs apresentam algum risco cardiovascular mas com diferentes gradientes de gravidade, que dependem do seu grau de seletividade de inibição da COX-2 que irá gerar um desequilíbrio maior ou menor entre as duas PGs. Em relação à pressão arterial, os inibidores seletivos da COX-2 podem transitoriamente induzir uma elevação de leve a moderada na pressão sanguínea pela diminuição da excreção de sódio urinário. Isso pode contribuir também para o aumento do risco cardiovascular. Essa alteração da pressão arterial pode também ser observada com o uso de AINHs tradicionais (Chaiamnuay et al.,2006).

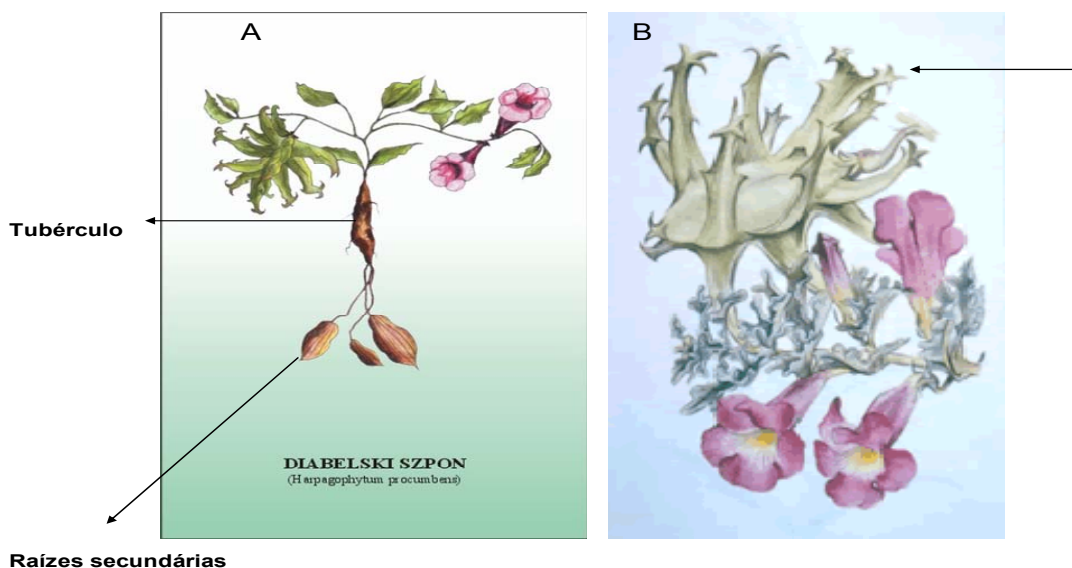
1.3 *Harpagophytum procumbens* (Família Pedaliaceae)

Harpagophytum procumbens [Burch] DC Ex Meissn. (garra-do-diabo) é uma espécie vegetal da família Pedaliaceae (Figura 5) e juntamente com *H. zeyheri* representam as duas únicas espécies do gênero. Originária do deserto de Kalahari, das estepes da Namíbia, Botswana e África do Sul (Brien et al., 2006), não é, portanto uma planta nativa do Brasil. *H. procumbens* é uma planta herbácea perene, conhecida popularmente como garra-do-diabo ou unha-de-diabo, nome dado em função do aspecto ramoso e lenhoso do fruto, provido de barbas semelhantes a garras. As raízes tuberosas primárias e secundárias de ambas as espécies são utilizadas por nativos africanos na forma de infusões para o tratamento de doenças reumáticas, diabetes, arteriosclerose e malária. Embora conhecidas desde o século XIX, somente após a primeira guerra mundial começaram os estudos sobre suas propriedades farmacológicas (para revisão ver Clarkson et al., 2003).

O extrato seco de raízes secundárias do *H. procumbens* (garra-do-diabo) tem como principais constituintes químicos os iridóides, presentes em concentração maior que os outros constituintes. Os iridóides são metabólitos secundários derivados da via da mevalonato (monoterpênicos), caracterizados por um grupo amplo de princípios amargos, constituídos por um núcleo fundamental formado pelo ciclopentano ligado a α -pirona, contendo um átomo de oxigênio (Benito et al., 2000). Os seus derivados são encontrados na natureza sob a forma de β -glicosídeos: foram denominados iridóides, por serem derivados do iridodial, composto isolado nas formigas da Austrália (*Iridomyrmex* spp.) (Costa, 2002). O principal princípio ativo do extrato é um iridóide glicosilado, o harpagosídeo (Figura 6), isolado em 1962 e responsável pelas inúmeras propriedades terapêuticas da planta, tendo sido a ele atribuído os efeitos antiinflamatórios bem como a ação sobre a síntese dos eicosanóides (Setty e Sigal, 2005).

Os outros componentes da planta são os ácidos terpênicos: oleanólico, β -acetiloleanólico e ursólico; a quinona harpagoquinona; alguns fitoesteróis como estigmasterol e β -sitosteróis; certos flavonóides como a lutoelina, kaempferol; os ácidos

fenólicos representados pelos ácidos clorogênico, cafeico e cinâmico livre; alguns aminoácidos; os açúcares (50%), principalmente estaquiose (46%) e pequenas concentrações de glicose, sacarose e rafinose. Não foram encontrados polissacarídeos como o amido. A presença de monossacarídeos confere uma alta solubilidade da fração de 50-70% em água. Os minerais presentes são: cálcio, cromo, ferro, magnésio, manganês, potássio, fósforo, selênio, silício e zinco. Seus tubérculos e suas raízes secundárias contêm uma mistura heterogênea de substâncias e, de acordo com os processos de extração, podem conter diferentes frações de constituintes com propriedades analgésicas e antiinflamatórias agonistas ou antagonistas, sinérgicas ou complementares (Loew et al., 2001).



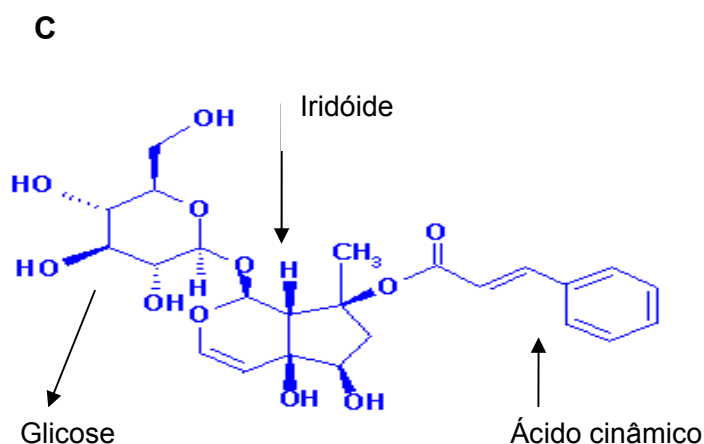


Figura 5 - Aspecto da planta com tubérculos e raízes secundárias responsáveis pelo seu efeito terapêutico (A). A seta indica o fruto que dá o nome popular (B). Estrutura química do harpagosideo (C).

Existem evidências demonstrando que os diferentes extratos de garra-do-diabo possuem diferentes mecanismos de ação e que são comparáveis aos dos AINH, pela interação da mediação nas vias metabólicas do AA, da COX e da LOX e também atuando na liberação das citocinas e na produção de NO (para revisão ver, Spelman et al., 2006). Estudos em modelos experimentais de inflamação realizados com extrato seco aquoso das raízes secundárias de *H. procumbens* (Lanhers et al., 1992) demonstraram efeitos analgésico e antiinflamatório dos extratos (Andersen et al., 2004). Estudos *in vitro* foram realizados para confirmação da ação dos extratos secos do *H. procumbens* ou do seu principal composto ativo, o iridóide glicosilado harpagosideo, na síntese de eicosanóides e na produção de NO. Em cultura de condrócitos de coelho, foi observado efeito condroprotetor do harpagosideo pela inibição da MMP - 2 (gelatinase A) (Chrubasik et al., 2006).

Fiebich et al., (2001) mostraram que a síntese de TNF- α em monócitos humanos estimulados por LPS foi inibida de modo dose dependente pelo extrato hidro alcoólico de *H. procumbens*. Entretanto, os iridóides harpagideo e harpagosideo não tiveram efeito sobre a liberação de TNF- α em doses baixas. Os mesmos extratos com concentrações maiores que 100 $\mu\text{g/ml}$ inibiram a liberação de citocinas, IL-6 e IL-1B e PGE₂. O extrato aquoso de *H. procumbens* suprimiu a síntese de PGE₂ e a produção de NO pela inibição da expressão de RNA-m em fibroblastos de ratos estimulados por LPS (Jang et al., 2003). Extratos de *H. procumbens* contendo porcentagens de 8,9% a 27% de harpagosideo foram incubados com células mesangiais de ratos para avaliar seus efeitos na formação de NO induzido pela IL-1 β e também na regulação da transcrição da enzima NOS. Os resultados mostraram que os extratos contendo 2% de harpagosideo não inibiram a formação de NO, sugerindo que somente extratos com grande conteúdo de harpagosideo causam inibição da NO sintase indutível (Kaszkin et al. 2004). O mecanismo de ação do harpagosideo foi investigado usando células HepG2 humanas e macrófagos RAW 264,7 estimuladas com LPS, e o resultado mostrou inibição do RNAm e expressão protéica da COX-2 e iNOS nas células HepG2. Essa inibição parece estar relacionada à modulação da atividade do fator de transcrição do NF- κ B (Huang et al., 2006).

As propriedades farmacocinéticas da garra-do-diabo e seus efeitos sobre a síntese dos eicosanóides (TxB₂ e LT) foram avaliados em voluntários sadios, e os resultados indicaram que não houve alteração nos níveis de TXB₂, havendo correlação entre os níveis séricos de harpagosideo e a inibição da síntese de LT. Os estudos farmacocinéticos mostraram que os níveis plasmáticos máximos de harpagosideo são alcançados após 1,3 a 2,5 horas (Loew et al., 2001).

Uma série de ensaios clínicos foi realizada para se aquilatar a eficácia clínica dos diferentes extratos de *H. procumbens*, aquosos ou hidro alcoólicos, contendo concentrações de harpagosideo entre 35 a 60 mg/dia no tratamento de OA de joelhos, coluna lombar e quadris. Um desses estudos foi realizado em comparação com uso de AINH, Vioxx (rofecoxibe) (12,5mg) para tratamento de pacientes com exacerbação da dor lombar (Chrubasik^a et al., 2003). Os resultados indicam não haver diferença de

tratamento entre os dois grupos. Em um outro estudo comparativo para tratamento de pacientes com OA de joelhos e quadril durante 4 meses com diacireina 100mg/dia e extrato aquoso de garra-do-diabo na dose de 2,6 g ao dia os resultados mostraram eficácia comparável, entretanto o extrato de garra-do-diabo foi superior em segurança (Chantre et al., 2000). Outro estudo, realizado com 250 pacientes com OA de joelhos, verificou a eficácia terapêutica do extrato aquoso de garra-do-diabo (60mg/dia de harpagosideo durante 8 semanas). Esse protocolo envolvia quadril e dor lombar inespecífica e foram realizadas avaliações com escala visual analógica (EVA), índice de Arthus para dor lombar e “Western Ontario and MacMaster Universities Osteoarthritis index” (WOMAC). Os resultados mostraram uma melhora de 50 a 70% nos parâmetros avaliados (Chrubasik^b et al., 2003).

O único ensaio *ex vivo* realizado para avaliar o efeito da garra-do-diabo sobre a síntese dos eicosanóides, TxB₂ e PGE₂ foi feito em voluntários sadios que utilizaram 2g do extrato seco contendo 3% de iridóides glicosilados por 21 dias. Entretanto, nesse estudo não especificada a quantidade de harpagosideo presente no extrato. Os autores não observaram nenhum efeito sobre a síntese dos eicosanóides (Moussard et al., 1992). É importante ressaltar que, devido a problemas metodológicos, esse estudo de Moussard permitiu avaliar unicamente a influência do extrato bruto sobre a atividade da COX-1. Os dados da produção de PGE₂ não refletiram a atividade da COX-2, pois foi avaliada em condições de não estimulação.

Ensaio *in vitro* realizados com onze tipos de iridóides isolados do *H. procumbens* mostraram que o iridóide 8-O-p-coumaroil harpagideo apresentou atividade inibidora do “burst” respiratório em macrófagos de rato, com valor de IC₅₀ de aproximadamente 32µM, sendo o valor encontrado para o harpagosideo de 200µM (Qi Ji et al., 2006). O resultado desse estudo sugere que nessa mistura heterogênea de iridóides presentes no extrato seco etanólico da garra-do-diabo talvez exista um ou mais iridóides que atuem reduzindo a resposta inflamatória por vias diferentes das descritas para o harpagosideo (Qi Ji et al., 2006).

O uso dos produtos contendo *H. procumbens* entre os pacientes com afecções reumáticas tem sido altamente prevalente nos últimos anos, portanto é importante determinar sua eficácia e segurança no tratamento da OA. A baixa incidência de eventos adversos e os baixos custos fazem com que os fitoterápicos representem uma alternativa no tratamento da OA ao invés do uso de antiinflamatórios tradicionais (Setty e Sigal, 2005).

A melhora no conhecimento da utilização dos fitoterápicos, como o extrato do *H. procumbens*, sua aplicabilidade, mecanismo de ação, doses apropriadas e formulações podem preencher a lacuna existente entre o uso folclórico das plantas medicinais e sua prescrição por médicos. Dessa maneira, o presente estudo inédito sobre os efeitos da garra-do-diabo e suas sub-frações sobre a atividade de COX-1, COX-2 e produção de NO visa contribuir para isso.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivos:

- Avaliar, em ensaio de sangue total, a influência do extrato de *H. procumbens* sobre as atividades da COX-1 e COX-2.
- Avaliar uma possível ação dos metabólitos do extrato sobre a atividade dessas enzimas e produção de NO em pacientes com OA de coluna lombar.
- Investigar a importância dos diversos constituintes do extrato bruto sobre a atividade dessas enzimas e produção de NO.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Extrato hidro alcoólico bruto (seco) das raízes secundárias de *Harpagophytum procumbens* (Burchell) DC. Ex Meissn. (Pedaliaceae) (garra-do-diabo), contendo 1,78% de harpagosideo, com certificado de procedência e atividade biológica.

3.2 Fracionamento do extrato

O fracionamento do extrato hidro alcoólico de *H. procumbens* e as análises fitoquímicas para obtenção e identificação das frações foram efetuadas no Instituto de Botânica de São Paulo e encontram-se resumidas no fluxograma da Figura 6.

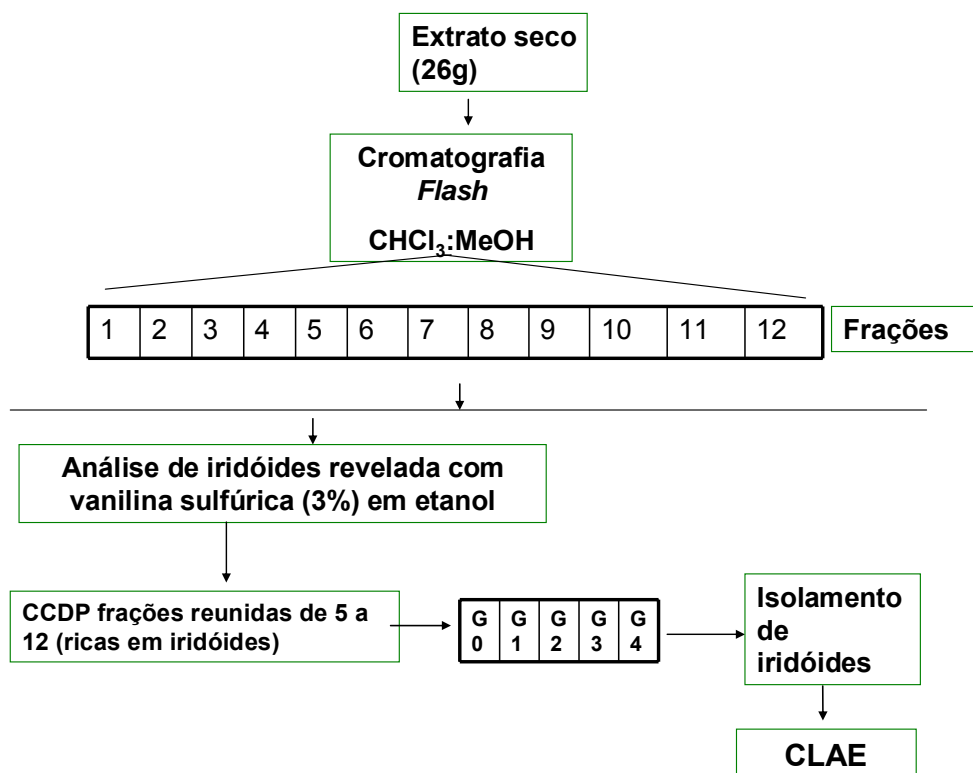


Figura 6 - Esquema do fracionamento do extrato seco da garra-do-diabo por cromatografia “flash” em coluna de sílica (200-400 mm Merck) com gradiente de eluição conforme (Zarate et al., 1992) e por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) (Huang et al., 2006). As frações obtidas por cromatografia “flash” foram monitoradas usando cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) e revelação com vanilina sulfúrica e cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE).

O extrato seco (26g) foi submetido a fracionamento em cromatografia “flash”, utilizando coluna de vidro de 13,5 cm x 2,0 cm e contendo 14g de sílica gel (200-400 mm) (Merck) formando uma coluna de 5 cm da fase estacionária. A coluna permaneceu sob vácuo, sendo que o eluente CHCl_3 : MeOH adicionado lentamente (100ml) nas proporções: 100% clorofórmio, 99:1, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 50:50, 100% metanol, resultando em 12 frações, conforme procedimento descrito por Huang et al. (2006). O rendimento das frações obtidas nesse fracionamento encontra-se na tabela 1.

Tabela 1- Peso e rendimento (%) das frações

Frações	Peso (g)	Rendimento (%)
F1(100)	0.0122	0.05
F2(99:1)	0.0261	0.10
F3 (98:2)	0.0169	0.07
F4 (96:4)	0.0181	0.07
F5 (94:6)	0.0138	0.05
F6 (92:8)	0.0297	0.11
F7 (90:10)	0.0467	0.18
F8 (85:15)	0.0494	0.19
F9 (80:20)	0.0499	0.19
F10 (70:30)	0.2517	0.97
F11 (50:50)	0.1267	0.49
F12(100%MeOH)	0.1379	0.53
Total	0.7791	

O monitoramento do fracionamento foi efetuado por cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) (Zarate et al., 1992) utilizando cromatoplasas de alumínio, recobertas com sílica gel 60 F 254 (Merck), eluídas com a mistura CHCl_3 : MeOH (75:25 v/v). As cromatoplasas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e reveladas com vanilina sulfúrica a 3% em etanol, um revelador que cora os iridóides (Chantre et al., 2000). As cromatoplasas foram fotografadas em sistema Camag Reprostar 3 a 256 e 366 nm e sob luz branca. Os resultados foram expressos em Rf. O perfil cromatográfico das 12 frações é apresentado nas Figuras 7 e 8.

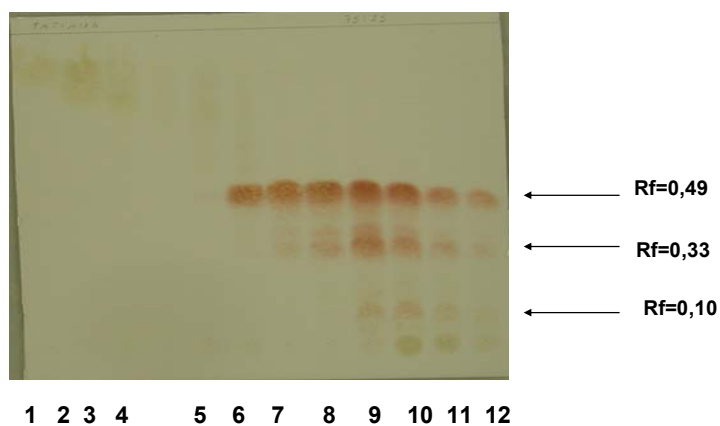
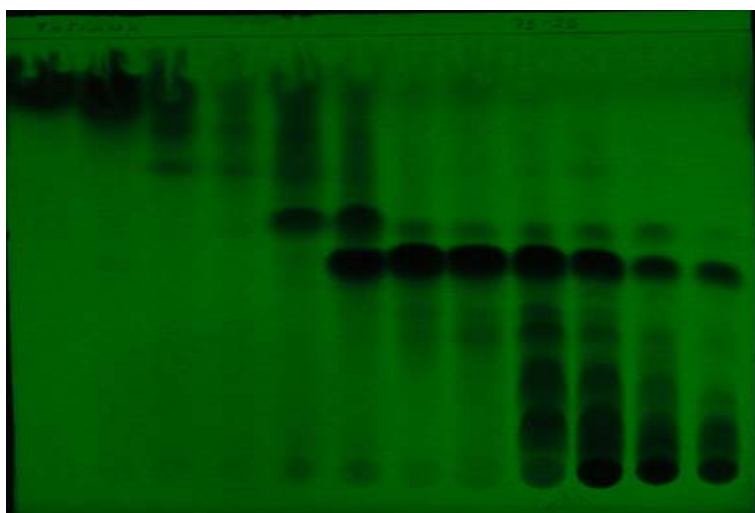


Figura 7 - Foto em sistema CAMAG da placa cromatográfica em CCDC das 12 frações do extrato de *H. procumbens* obtidas por cromatografia “flash”, e revelada com vanilina sulfúrica (3%). Eluição com CHCl_3 : MeOH (75:25 v/v) , mostrando os iridóides glicosilados.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Figura 8 - Foto em sistema CAMAG da placa cromatográfica em CCDC das 12 frações do extrato obtidas por cromatografia “flash”. Eluição em CHCl_3 : MeOH (75:25 v/v) e visualização no comprimento de luz UV curto (256 nm).

As frações de F5 a F12 foram reunidas e alíquotas de cinco μl foram aplicadas nas placas cromatográficas de sílica gel 60 P₂₅₄ (Merck) com 1mm de espessura, preparadas segundo Sthal (1969), eluídas em CHCl_3 : MeOH (75:25 v/v) e visualizadas em câmara de UV a 254nm e 366nm para determinação das áreas onde ficaram adsorvidas as substâncias. As cinco sub-frações (G0 a G4) obtidas foram eluídas da sílica com metanol e o solvente eliminado em evaporador rotatório, pesadas e armazenadas para análise. O perfil cromatográfico dessas sub-frações obtido com vanilina sulfúrica foi coerente com aquele descrito por Chantre et al., (2000). As três manchas de cor lilás de Rfs = 0,10; 0,33 e 0,49 foram atribuídas aos iridóides harpagideo, 8-p-coumaroil harpagideo e o harpagosideo, respectivamente. (Figura 9)

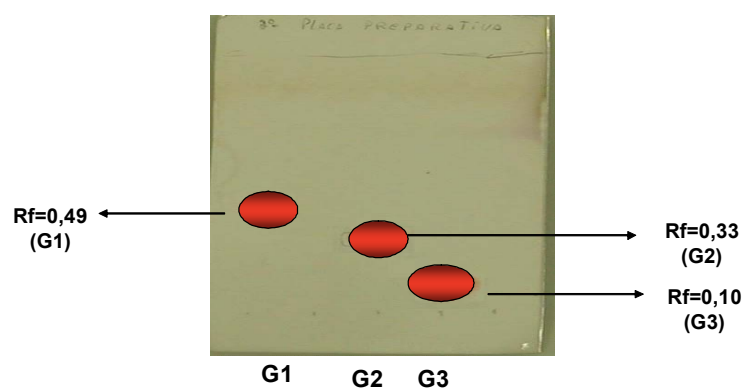


Figura 9 - Cromatograma em CCDC das frações G1, G2 e G3 obtidas por CCPD. Rf= 0,49 (harpagosideo), Rf= 0,33 (8-p-coumaroil harpagide), Rf= 0,10. Eluída em CHCl_3 : MeOH (75:25) e revelada com vanilina sulfúrica (3%)

As frações de 5 a 12 obtidas por cromatografia *flash* e as frações G1, G2 e G3 obtidas pela CCPD ricas em iridóides (teste positivo com vanilina sulfúrica) foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Varian Pro-Star série 00368, equipado com detector UV/Vis Pro-Star modelo 310, sistema de bomba Varian Pro-Star modelo 330, Workstation Star versão 6, 41, coluna analítica de

fase reversa C-18, 90 A, tamanho de 150 mm x 4,6mm com partículas de 5 mm de diâmetro. Foram aplicados 20 μ L de cada amostra filtrada em Millex HV 0,45 μ m, utilizando como fase móvel da bomba A, água deionizada 50% e na bomba B, metanol grau CLAE (Baker). A eluição foi realizada com fluxo de 1mL/min, a detecção foi efetuada em 278 nm e o tempo de corrida foi de 30 minutos (Chantre et al., 2000; modificado). Os resultados foram expressos em tempo de retenção (Tr) em minutos e a concentração em %.

A mistura das frações de 5 a 12 obtidas por cromatografia *flash* foi denominada extrato B para os ensaios *in vitro*, e correspondem às frações ricas em iridóides (figura 10). Essa mistura de frações foi analisada em CLAE e os resultados mostraram que o harpagosideo estava presente na concentração de 56,1% e o ácido cinâmico na concentração de 25,8%. As doses utilizadas nos ensaio foram de: 1 (30 μ g/ml), 2 (100 μ g/ml) e 3 (300 μ g/ml).

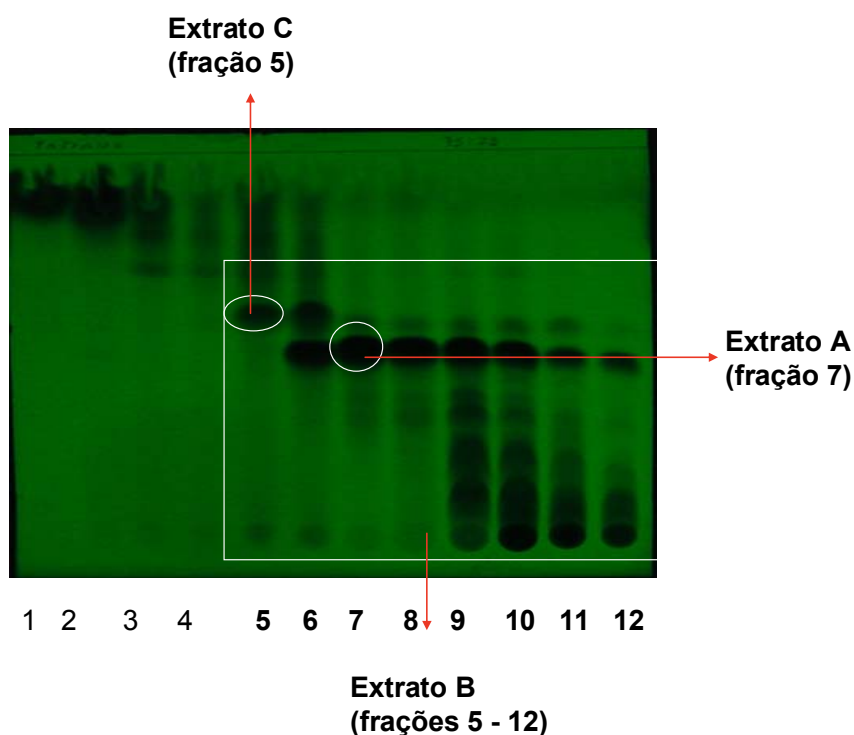


Figura 10 - Perfil cromatográfico das frações de 1 a 12 (CCDC) mostrando a seleção dos extratos A, B e C utilizados nos ensaios *in vitro*.

A fração 5, obtida por cromatografia “flash” e denominada de extrato C (figura 10) foi selecionada com base na concentração de 2,7% harpagosideo e 84,6% de ácido cinâmico (CLAE) (figura 11). Os dados de deslocamento químico do espectro de $^1\text{HRMN}$ que confirmaram a presença de ácido cinâmico livre nessa fração estão descritos a seguir. As doses utilizadas no ensaio foram 1 (30 $\mu\text{g/ml}$), 2 (100 $\mu\text{g/ml}$) e 3 (300 $\mu\text{g/ml}$).

A fração 7, obtida por cromatografia *flash*, denominada extrato A (figura 11) para os ensaios *in vitro*, foi selecionada com base na concentração de 88,6% harpagosideo CLAE (figura 12), sem ácido cinâmico. As doses utilizadas no ensaio foram de 1(30 μM), 2(100 μM) e 3 (300 μM).

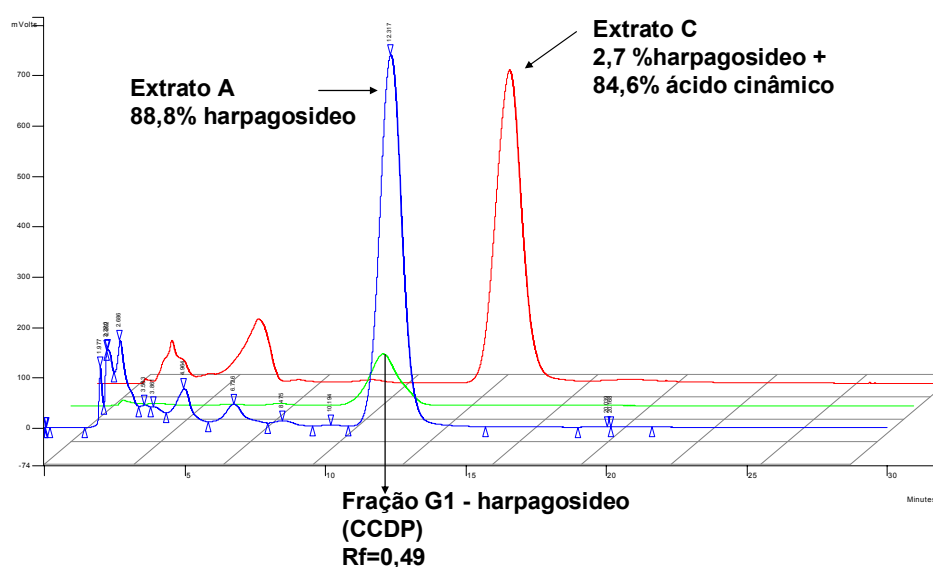


Figura 11 - Cromatogramas em sistema CLAE das frações obtidas por CCDP. Fase móvel A 50% metanol/fase móvel B 50%, fluxo de 1 ml/min, λ 278 nm, 30 minutos de tempo de eluição. Varian Pro Star. Ensaio *in vitro*: Azul extrato A=88,8% harpagosideo; Vermelho =extrato C= 2,7% harpagosideo e 84,6% ácido cinâmico livre. Verde = fração G1 (CCDP) Rf= 0,49= harpagosideo.

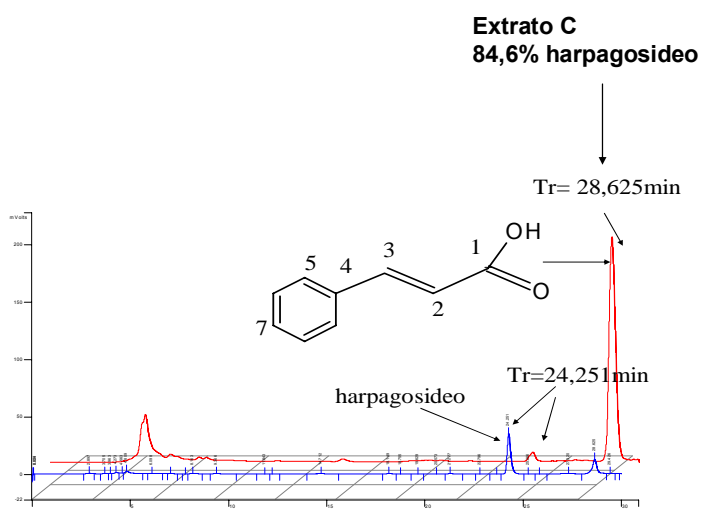


Figura 12 – Cromatogramas em sistema CLAE em coluna phenomenex Luna 5uC 18250 X 4,60mm, bomba A H₂O deionizada (50%) e bomba B metanol grau HPLC (Baker) (50%), fluxo de 1 ml/min, λ 278 nm, em 30 minutos, em sistema Varian Pro Star. Azul =extrato B= mistura das frações 5 a 12, a seta assinala o tempo que o harpagosideo aparece no sistema CLAE. Vermelho = extrato C 84,6 % de ácido cinâmico e a estrutura química do harpagosideo.

3.3 Ensaio em sangue total da atividade da COX-1 e COX-2

Dentre as diferentes técnicas utilizadas para a avaliação da atividade das enzimas COX-1 e COX-2 optou-se pelo método descrito por Patrignani et al., (1994) que expressa o resultado da atividade da COX-1 pela produção de TxB₂ por plaquetas durante a coagulação e a atividade da COX-2 pela produção de PGE₂ em sangue humano total estimulado por LPS de *Escherichia coli*. Esse método permite avaliar a eficácia seletiva de drogas inibidoras de COX-2 em triagens clínicas, sendo o único método que permite ensaios *ex vivo* de drogas com potencial antiinflamatório.

3.4 Ensaios *in vitro*

3.4.1 Avaliação da atividade da COX-1

Uma amostra de 500 μ L de sangue venoso sem anticoagulante foi incubada por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂. Após centrifugação (5 minutos, 1500 rpm), uma alíquota de 100 μ l de plasma (sobrenadante) foi misturada a 400 μ l de metanol, para precipitação de proteínas e o sobrenadante (200 μ l) armazenado a -70°C para posterior quantificação de TxB₂ por radioimunoensaio (Patrignani et al., 1994).

3.4.2 Avaliação da atividade da COX-2

Uma amostra de 500 μ l de sangue venoso contendo 10 UI (1 gota) de heparina foi incubada com 10 μ l/ml de LPS por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Esse mesmo protocolo foi utilizado para incubação com extrato bruto hidro-alcoólico da garra-do-diabo e suas frações. Para avaliação da atividade basal da enzima, um tubo controle foi incubado sem LPS. Após centrifugação, uma alíquota de 100 μ l de plasma foi misturada a 400 μ l de metanol para precipitação de proteínas e o sobrenadante foi estocado a -70°C, para posterior quantificação de PGE₂ (200 μ l em cada eppendorf) por radioimunoensaio (Patrignani et al., 1994, Mello et al., 2000).

3.4.3 Quantificação de TXB₂ e PGE₂

As concentrações de TXB₂ e PGE₂ no sobrenadante seco por aeração com nitrogênio foram determinadas por radioimunoensaio com separação magnética empregando-se reagentes disponíveis comercialmente. Após a reconstituição dos reagentes com tampão, aos tubos 1 e 2 foram acrescentados 900 μ l do tampão e 100 μ l do eicosanóide marcado (contagem total); nos tubos 3 e 4, 200 μ l de tampão, 100 μ l do eicosanóide marcado (contagem não específica); nos tubos 5 e 6, 100 μ l do tampão,

100µl do eicosanóide marcado e 100µl de anti-soro não específico (B0). Os tubos 7 e 8 receberam 10µl do eicosanóide marcado, 100µl do anti-soro e 100µl do eicosanóide em duplicata em concentrações determinadas. Nos demais tubos foram colocados 100µl das amostras, 100µl do eicosanóide marcado e 100µl do anti-soro. Após incubação por 24 horas a 4°C, foram adicionados a todos os tubos, exceto nos tubos 1 e 2, 750µl de uma suspensão de carvão magnético coberto por dextran e os tubos foram submetidos à centrifugação para separação magnética. O sobrenadante foi transferido para os frascos contendo 7 ml de líquido de cintilação e estes levados para contagem. Da média do número de contagens por minuto de cada amostra, foi subtraída a média da ligação não específica; o resultado foi dividido pela contagem total; o resultado foi dividido por aquele encontrado na ausência do ligante frio (B0) e foi expresso na forma de porcentagem, sendo os valores das concentrações padrões dos ligantes frios plotados em gráfico contra as concentrações. Os valores em pg/ml das amostras foram obtidos desse gráfico.

3.4.4 Ensaio *in vitro* – efeito do extrato bruto da garra-do-diabo na atividade enzimática da COX-1 e COX-2.

Para os ensaios *in vitro*, foram selecionados dentro do serviço de Reumatologia cinco voluntários saudáveis, que não estavam tomando nenhum tipo de droga antiinflamatória pelo menos 15 dias antes do ensaio. O extrato hidro alcoólico bruto das raízes secundárias do *H. procumbens* foi dissolvido (1mg/1ml) em água destilada e 10µl de cada solução foram adicionados aos tubos. A concentração final de *H. procumbens* no ensaio foi de 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 µg. Essas concentrações representam doses crescentes de harpagosídeo presentes em cada tubo e variaram de 1,12 a 17,8 µg.

3.4.5 Ensaio *in vitro* - efeito das diferentes frações da garra-do-diabo na atividade enzimática da COX-1 e COX-2 e produção de NO

As frações com diferentes composições e concentrações de harpagosideo foram preparadas e utilizadas no ensaio *in vitro* para avaliação da atividade de COX-1, COX-2 e NO em sangue venoso de voluntários sadios sem uso de AINH por um período de 15 dias. As doses utilizadas foram: dose 1 contendo 30 μ M do extrato A e 30 μ g/ml dos extratos B e C; dose 2 100 μ M de A e 100 μ g/ml de B e C; dose 3 foram 300 μ M de A e 300 μ g/ml dos extratos B e C. Como controles positivos foram utilizados indometacina 40 μ M como inibidor da atividade da COX-1 e etoricoxibe 300 μ M como inibidor seletivo da atividade da COX-2 (Tacconelli et al., 2002).

Os ensaios para atividade da COX-1 e COX-2 foram realizados como descrito anteriormente no item ensaio *in vitro*. e produção de NO foi determinado como descrito a seguir.

3.5 Análise dos metabólitos do NO - NO₂⁻ e NO₃⁻

Uma amostra de 500 μ l de sangue venoso periférico sem anticoagulante foi retirada de voluntários sadios (ensaio *in vitro*) e foi adicionada a um tubo contendo 10 U de heparina (1 gota) , 10 μ l de LPS e acrescidos de 10 μ l da dose das frações do extrato seco a ser testada. Para avaliação da produção basal de NO, um tubo controle foi incubado sem LPS. Os tubos contendo as amostras foram estimulados com LPS e incubados por 24h a 37°C com as mesmas frações utilizadas no ensaio *in vitro*. A quantificação de nitrito e nitrato foi realizada através da reação enzimática colorimétrica de Griess. A desproteinização das amostras foi realizada em plasma diluído a ½ em água miliQ, seguida por filtragem em filtro Milipore estéril de 0,44 μ m. Para as dosagens de NO₂⁻ e NO₃⁻ foram misturados 200 μ l da amostra filtrada, 100 μ l de NADPH, 100 μ l de FAD, e 200 μ l de tampão padrão. Nos tubos para dosagem de NO₂⁻, foram adicionados 100 μ l de água e nos tubos para dosagem de NO₃⁻ 100 μ l da enzima nitrato

redutase (Sigma). Os tubos com as amostras, bem como os das curvas padrão para NO_2^- e NO_3^- , foram incubados por 1 h a 25°C em banho - maria. Em seguida, os tubos foram imersos em banho por 3 minutos. Foram adicionados aos 200 μl dessas amostras 400 μl de reagente de Griess (Sigma) e após 10 minutos de incubação a 60°C , foi efetuada leitura em espectrofotômetro (Hitashi U-2000) a 546 nm. Nessas condições, o método tem sensibilidade de 30pmol para cada íon. Os resultados foram expressos como valores médios dos ensaios realizados em duplicata contra as respectivas curvas padrão. (Gillian et al., 1993). Os valores foram apresentados como a soma dos valores de NO_2^- e NO_3^- (μM) para cada amostra (Ding et al., 1988)

Esta determinação foi também realizada no sangue das pacientes selecionadas para o ensaio *ex vivo* antes e após o tratamento.

3.6 Seleção das pacientes

O ensaio clínico foi realizado com 20 pacientes selecionadas de acordo com um protocolo clínico adaptado daquele proposto por Chrubasik^a et al. (2003). A adaptação foi necessária uma vez que algumas medidas e questionários utilizados no referido protocolo ainda não se encontram validados para a língua portuguesa. Os critérios de inclusão foram os seguintes:

- (a) OA de coluna lombar com dor por pelo menos seis meses, não atribuída a qualquer causa específica como: prolapso discal, dor no quadril, espondilolistese, osteomalácia ou artrite reumatóide (AR);
- (b) Queixa de exacerbação da dor por pelo menos oito semanas em repouso ou ao movimento;
- (c) Valores maiores ou iguais a 5 na escala visual analógica horizontal de dor;

(d) Necessidade de tratamento sintomático por um período de seis semanas avaliado pelo examinador.

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

(a) Trauma recente e possibilidade de fratura;

(b) Participação em outro ensaio no período de 30 dias;

(c) Doenças sistêmicas graves como: neoplasias, hepatite auto-imune, cirrose biliar, doenças hematológicas (anemia aplástica, plaquetopenia) e alteração da função renal;

(d) Histórico de abuso de álcool ou drogas;

(e) Alergia ao fito-terápico e

(f) Dificuldade de compreensão.

Outras considerações tardias poderiam afastar as pacientes do estudo, tais como uma perda acentuada de peso, fatores de risco para infecção medular ou sintomas de acometimento da cauda eqüina.

As 20 participantes receberam informações verbais e escritas sobre o estudo antes de serem convidadas a participar e deram consentimento por escrito de acordo com protocolo aprovado pelo Conselho de ética da Universidade de São Paulo (Anexo 1).

Nenhuma paciente fez uso de antiinflamatório não hormonal ou hormonal, sulfato de glucosamina e condroitina, diacireína ou estatinas por um período de 15 dias antes do início do ensaio. Foi permitido o uso de cloridrato de tramadol (50mg) como medicação de resgate. As pacientes com fibromialgia associada não utilizaram antidepressivos tricíclicos e foram monitoradas quanto ao número inicial e final dos pontos de gatilho (Anexo 2).

Todas as pacientes foram recrutadas em consultório particular na cidade de São Paulo. Para cada paciente uma ficha clínica com seus dados pessoais, peso, altura e índice de massa corporal, atividade física (tipo/duração/tempo), tempo de doença, comorbidades e medicações em uso, foi preenchida (Anexo 2).

Cada paciente, antes e depois do tratamento, foi examinada (medida da distância mão chão (DMC) e teste de Thomas) e respondeu aos questionários (“Health assessment questionnaire” (HAQ), questionário de incapacidade de Roland-Morris (RM) e avaliação global do tratamento). Amostras de sangue foram coletadas para análises laboratoriais, tais como velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C reativa (PCR), cálcio, colesterol e fator reumatóide (FR) e para os ensaios *ex vivo*. A escala analógica visual (EVA) foi utilizada como parâmetro de inclusão no estudo.

3.6.1 Avaliação da flexibilidade da coluna lombar e questionários

A - Medida da distância mão chão

O teste DMC foi realizado instruindo a paciente a ficar em pé com os pés afastados em uma distância de aproximadamente 15 cm. Nesse teste, o observador permanece atrás para observar as costas durante o movimento e adicionalmente observa-a de lado para uma melhor vista do contorno da curva lombo sacro. A distância entre o dedo médio e o chão foi medida sem que a paciente dobrasse os joelhos (Grom et al., 2000) (Anexo 2).

B - Teste de Thomas

O teste de Thomas foi realizado para avaliação da flexibilidade do quadril. O teste consiste em deitar a paciente em posição supino sobre a mesa de exames, um joelho é levado ao peito da paciente e mantido por alguns segundos. É necessário que a região inferior da coluna lombar permaneça sobre a mesa. Na presença de uma

contratura em flexão do quadril, a perna estendida dobrará no nível do joelho e a coxa elevar-se-á da mesa (Grom et al., 2000) (Anexo 2).

C - Questionário sobre a avaliação de saúde

O HAQ foi também avaliado com a finalidade de medir o desgaste psicológico associado com a dor lombar como parte do protocolo utilizado por Chrubasik^a et al. (2003) (Anexo 4).

D - Questionário de incapacidade Roland Morris (RM)

O questionário RM foi respondido pelas pacientes antes e depois do tratamento (Martin et al., 2000). Esse questionário é simples, curto e facilmente entendido e enfoca exclusivamente as funções motoras (andar, curvar, vestir, sentar, deitar, dormir e cuidar-se). Apresenta escore com 24 pontos no qual a paciente assinala qual (is) a(s) frase (s) que descreve(m) a sua dor lombar naquele momento; as alterações de 2 a 3 pontos no escore são consideradas critérios de melhora para quadro de dor crônica (Anexo 5).

3.6.2 Exames de imagem

Os exames de Rx e a RNM da coluna lombar foram realizados antes do início do tratamento para a caracterização do grau de OA das pacientes. A classificação de Modic utilizada foi usada para interpretação da doença degenerativa lombar discal com mudança no sinal adjacente na medula (Jones et al., 2005).

Essas mudanças à RNM podem ser caracterizadas por hipossinal em T₁, hiperssinal em T₂ e realce na fase pós-contraste, indicando edema no osso subcondral (Modic I). Com a evolução do processo, ocorre a substituição da medula hematopoiética por medula amarela (gordurosa) devido regressão do quadro

inflamatório visualizado como aumento do sinal em T₁ e em T₂ e ausência de realce (Modic II); na fase tardia do processo existe o predomínio de esclerose óssea (tecido fibrótico e neoformação óssea) caracterizada por um aumento de densidade nos Raios-X e por áreas de hipossinal em T₁ e T₂ sem realce (Modic III).

3.7 Ensaio *ex vivo*

Uma amostra 5 ml de sangue total de cada paciente participante foi coletada antes e após o tratamento com garra-do-diabo para avaliação da ação terapêutica nas atividades das enzimas COX-1, COX-2 e produção de NO. Todos os passos para essas avaliações já foram descritos acima no item ensaio *in vitro*.

Nesse protocolo, cada paciente recebeu 180 cápsulas gelatinosas contendo 500 mg do extrato hidro alcoólico seco das raízes secundárias da garra-do-diabo, para serem ingeridos (VO) quatro vezes ao dia, por seis semanas. O conteúdo diário de harpagosideo foi de 35,6 mg (ESCOP, 1997).

3.8 Análise estatística

Os resultados dos valores não paramétricos foram expressos em mediana (variação). As comparações dentro do mesmo grupo foram analisadas por teste “t-Student” e quando a distribuição normal foi observada, os resultados foram expressos em média ± e.p.m. Para as medidas analisadas, o valor significativo foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio clínico

O ensaio clínico foi realizado em 20 pacientes que apresentavam OA de coluna lombar com exacerbação da dor. O tratamento com extrato bruto de garra-do-diabo na dose de 2g/dia, contendo 35,6mg de harpagosideo, foi mantido por seis semanas.

Nossa casuística está apresentada na Tabela 2. A média de idade das pacientes foi de 58 anos, variando entre 44 a 69 anos; a duração média da doença foi de 8,5 anos (2 - 20 anos), 55% das pacientes (11) tinham fibromialgia antes do tratamento, entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos com e sem fibromialgia frente aos parâmetros analisadas ($p>0,05$). Cerca de 85% das pacientes realizavam atividade física por ocasião do estudo.

Tabela 2 - Características antropométricas e dados clínicos das 20 pacientes no início do ensaio clínico

Parâmetros avaliados	Valores
Idade (anos)	58 (44 – 69)
IMC (kg/m ²)	26,8 (20,8 – 36,4)
Tempo de doença (anos)	8,5 (2 – 20)
Dor a menos de 8 anos (%)	40
Fibromialgia (%)	55
Modic – Tipo II (%)	98

O quadro de OA de coluna lombar foi confirmado por exames de Raios-X e RNM e classificado pelo índice de Modic. As pacientes foram classificadas como sendo 98% do tipo II e 2% do tipo I. Os resultados da avaliação clínica e parâmetros laboratoriais antes e depois do tratamento estão resumidos na tabela 3. Os valores de cálcio, EVA, DMC e RM foram reduzidos pelo tratamento ($p < 0,05$). A avaliação funcional (HAQ) embora tenha melhorado, não atingiu níveis de significância estatística ($p = 0,063$). O VHS não foi alterado pelo tratamento. A prova de atividade inflamatória, proteína C reativa (PCR) foi realizada por todas as pacientes e os resultados foram $< 0,5$ mg/dL antes do tratamento e após o tratamento.

Tabela 3. Avaliação clínica das 20 pacientes antes e após o tratamento com 2g/dia do extrato da garra-do-diabo por 6 semanas.

Parâmetros	Antes do tratamento	Após tratamento	Valor de z	p
VHS	13,5(3 -49)	10(2 -51)	-1,43	0,153
Cálcio Total	9,65 (8,6-10,6)	9,2 (7,8-9,8)	-2,66	0,008*
Colesterol total	202(149 - 332)	204(162 - 313)	-0,4	0,687
EVA	6 (5 -8)	3,5 (0 -9)	-3,36	0,001*
DMC	13,5 (0 -36)	8 (0 -21)	-2,17	0,030*
HAQ	0,75(0,1-1,5)	0,44(0,0-1,7)	-1,86	0,063
RM	9 (2 -20)	4,5 (0 -19)	-2,84	0,005*

Os resultados estão expressos como mediana (valores mínimo-máximo)

* $p < 0,05$ por comparação entre os valores antes e após o tratamento

O teste de Thomas foi realizado antes do tratamento e nenhuma paciente apresentou alterações da mobilidade dos quadris (Anexo 2).

A avaliação da dor em outros locais que não a coluna lombar, antes e após o tratamento foi realizada utilizando-se um questionário específico (Anexo 3). Antes do tratamento, as pacientes apresentavam dor nos ombros (5 pacientes), joelhos (5 pacientes), coluna cervical (3 pacientes), cotovelos (3 pacientes), pés (1 paciente), mãos (1 paciente) e quadril (1 paciente). O tratamento promoveu melhora do quadro doloroso em 17 pacientes (85%). O único efeito adverso relatado por três pacientes foi dispepsia, o que não impediu a continuidade do tratamento. Embora permitido, nenhuma paciente fez uso do tramadol.

4.2 Ensaio *in vitro*

4.2.1 Ensaio *in vitro*: efeito do extrato bruto hidro alcoólico da garra-do-diabo na atividade de COX-1 e COX-2:

Na figura 13 estão apresentados os resultados da co-incubação de doses crescentes do extrato bruto hidro alcoólico da garra-do-diabo em sangue total de 5 indivíduos sadios . A atividade da COX-1 está representada pela produção de TXB₂ (linha) e a atividade da COX-2 pela PGE₂ estimulada com LPS (barras). Os resultados estão expressos em % de inibição, em relação ao mesmo sangue estimulado com LPS sem o extrato. Os dados mostraram que não houve ação direta do extrato bruto, em nenhuma das doses testadas, sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2.

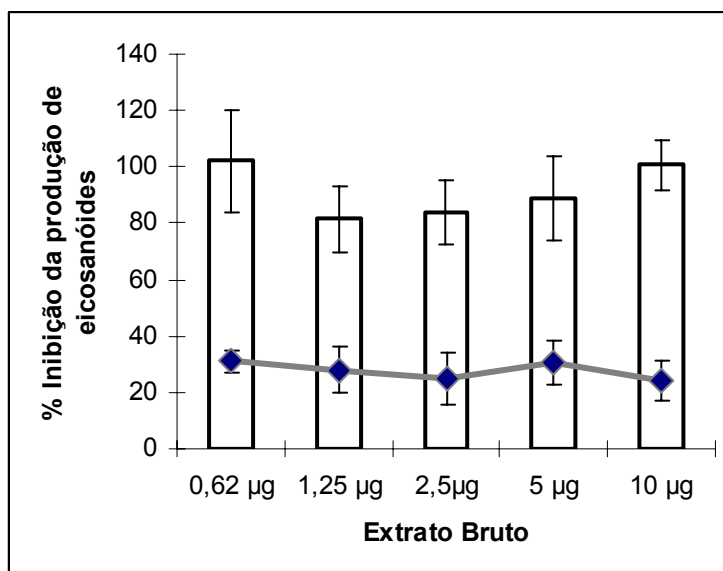


Figura 13 - Efeito de doses crescentes do extrato bruto da garra-do-diabo sobre a produção de PGE₂ e TXB₂ *in vitro*. Os resultados estão expressos em % de inibição ± e.p.m. da produção de PGE₂ (barras) em comparação com valores controles (sem extrato) em sangue total de indivíduos saudáveis (n=5) estimulados com LPS por 24h como reflexo da atividade da COX-2 dos monócitos. A porcentagem de inibição de TXB₂ ± e.p.m. em sangue total incubado por 1 h como indicador da atividade da COX-1 está representada pela linha.

4.3 Ensaio *ex vivo* para avaliação da atividade da COX-1, COX-2 e produção de NO em sangue total.

Para investigar os possíveis efeitos dos metabólitos da garra-do-diabo nas atividades da COX-1 e COX-2 e produção de NO e possíveis correlações com a melhora clínica, 20 pacientes com OA de coluna lombar foram tratadas com 2g/dia de extrato hidro alcoólico do *H.procumbens* por 6 semanas. Os resultados dos ensaios *ex vivo* realizados com o sangue total dessas pacientes, antes e após o tratamento, estão apresentados na figura 14. No painel A vemos que o uso da garra-do-diabo promoveu aumento da atividade de COX-1 (16,5 pg/ml vs 32,3 pg/ml TxB₂, p=0,037). Na figura 14B temos os resultados da produção de PGE₂ que é consequência da atividade da COX-2. A produção basal desse eicosanóide, sem a estimulação por LPS, foi afetada pelo tratamento (antes 12,2 pg/ml vs 41,0 pg/ml após o tratamento, p=0,004). Entretanto, a estimulação com LPS não promoveu um aumento adicional na atividade da COX-2 (66,0 pg/ml vs 54,0 pg/ml de PGE₂, p=0,024).

Nas nossas condições experimentais não detectamos alterações na produção de NO em decorrência do tratamento (dados não apresentados).

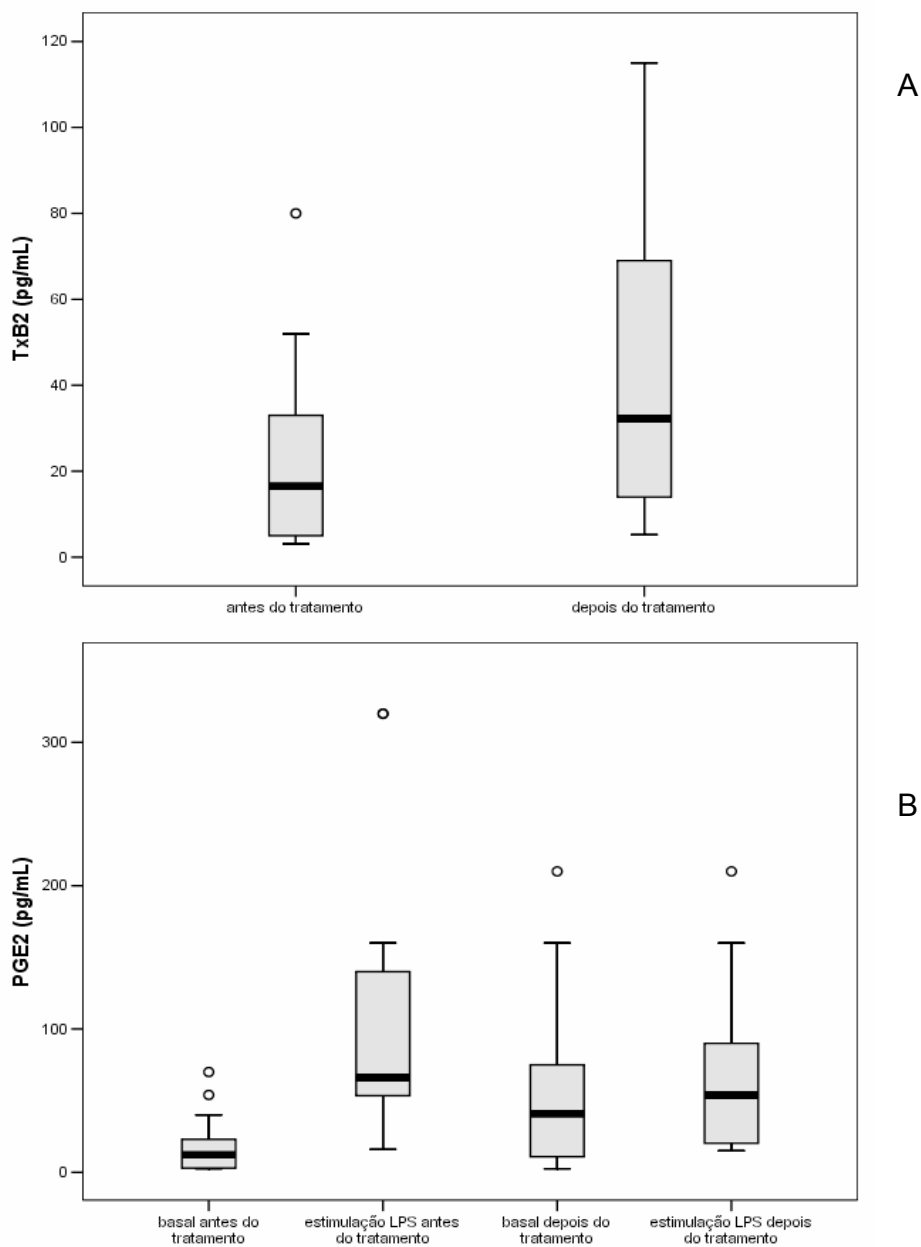


Figura 14 –Painel A- Atividade da COX-1 no sangue total de 20 pacientes com OA antes e após o tratamento com extrato bruto hidro alcoólico da garra-do-diabo (2g/dia com 35,6 mg de harpagosideo) por 6 semanas. Figura 14 B - Atividade da COX-2 das pacientes antes e após o mesmo tratamento (sem e com estimulação de LPS). * $p < 0,05$ vs antes do tratamento; # $p < 0,05$ vs s/LPS.

4.4 Efeito das diferentes frações do extrato da garra-do-diabo na atividade da COX-1, COX-2 e produção de NO

O efeito das frações isoladas por HPLC do extrato da garra-do-diabo: **extrato A**, 88,8% de harpagosideo nas doses 30 μ M, 100 μ M, e 300 μ M, **extrato B**, mistura de iridóides contendo 56,1% de harpagosideo e 25,8 de ácido cinâmico, e **extrato C**, 2,7% harpagosideo + 85,6 % de ácido cinâmico livre nas doses de 30 μ g/ml, 100 μ g/ml e 300 μ g/ml, sobre a atividade da COX-1 e COX-2 e produção de NO foram avaliados pela quantificação de TXB₂ e PGE₂ e dosagem de NO⁻²/NO⁻³ no sangue total de indivíduos sadios (n=4) incubados com concentrações variáveis de harpagosideo. Indometacina 40 μ M e etoricoxibe 300 μ M foram utilizados como controles positivos para inibição das atividades das enzimas, COX-1 e COX-2, respectivamente.

Os resultados dos ensaios indicaram ação direta do extrato A, nas 3 doses testadas, e da indometacina na atividade da COX-1 quando comparado com à produção controle de TXB₂ (incubada com salina). Os demais extratos, bem como o etoricoxibe, não alteraram a atividade da enzima (figura15).

Os resultados apresentados na figura 16 indicam uma inibição na atividade da COX-2 obtida pela incubação com extrato A (30 μ M) bem como dos controles positivos, indometacina e etoricoxibe, quando comparados ao controle da produção de PGE₂ sob estimulação c/ LPS incubado com solução salina. Não foi observado nenhum efeito estimulatório ou inibitório na atividade da enzima com os demais extratos testados.

Os resultados dos ensaios *in vitro* de produção de NO estão apresentados na figura 17. Os dados mostram redução na produção de NO pelo sangue total sob estimulação por LPS, sob incubação com os extratos A e C nas doses menores (30 μ M e 30 μ g/ml) quando comparados com controle de produção de NO c/LPS incubado com solução salina. Os demais extratos, bem como indometacina e etoricoxibe, não alteraram a produção de NO.

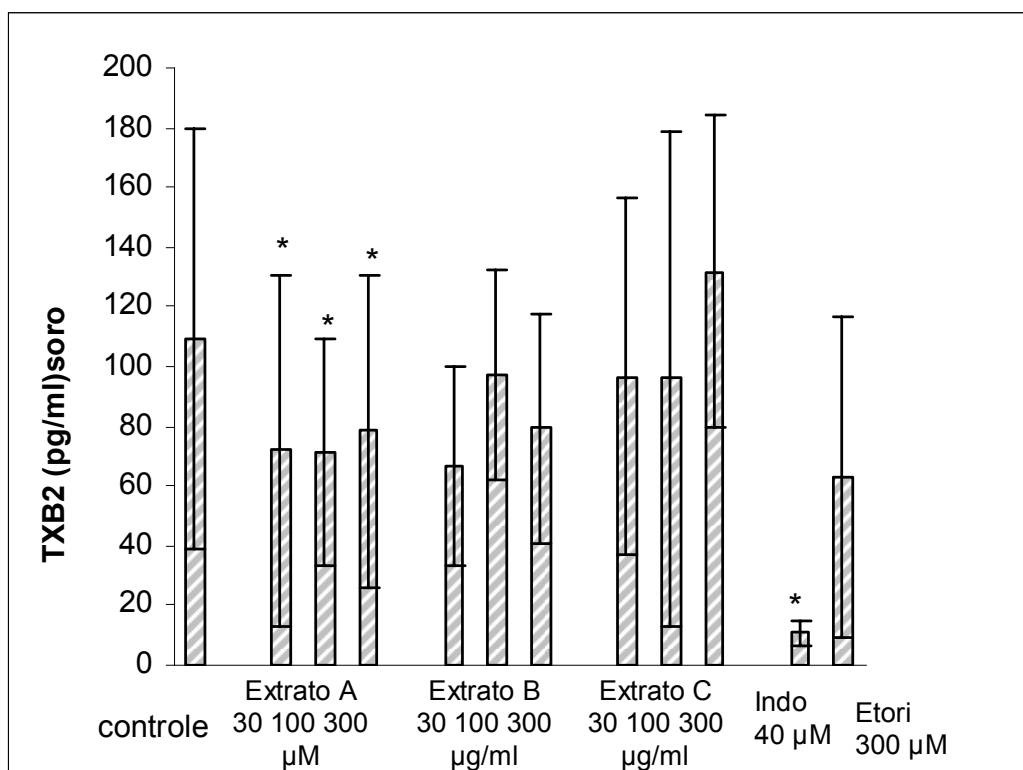


Figura 15 – Atividade da COX-1: Efeito dos extratos A, B e C com diferentes constituintes e quantidades de harpagosideo, indometacina (Indo 40µM) e etoricoxibe (Etori 300µM) sobre a produção de TXB₂ em sangue total de voluntários sadios (n=6). Os resultados estão expressos em média ± e.p.m. pg/ml de TXB₂ * p<0,05

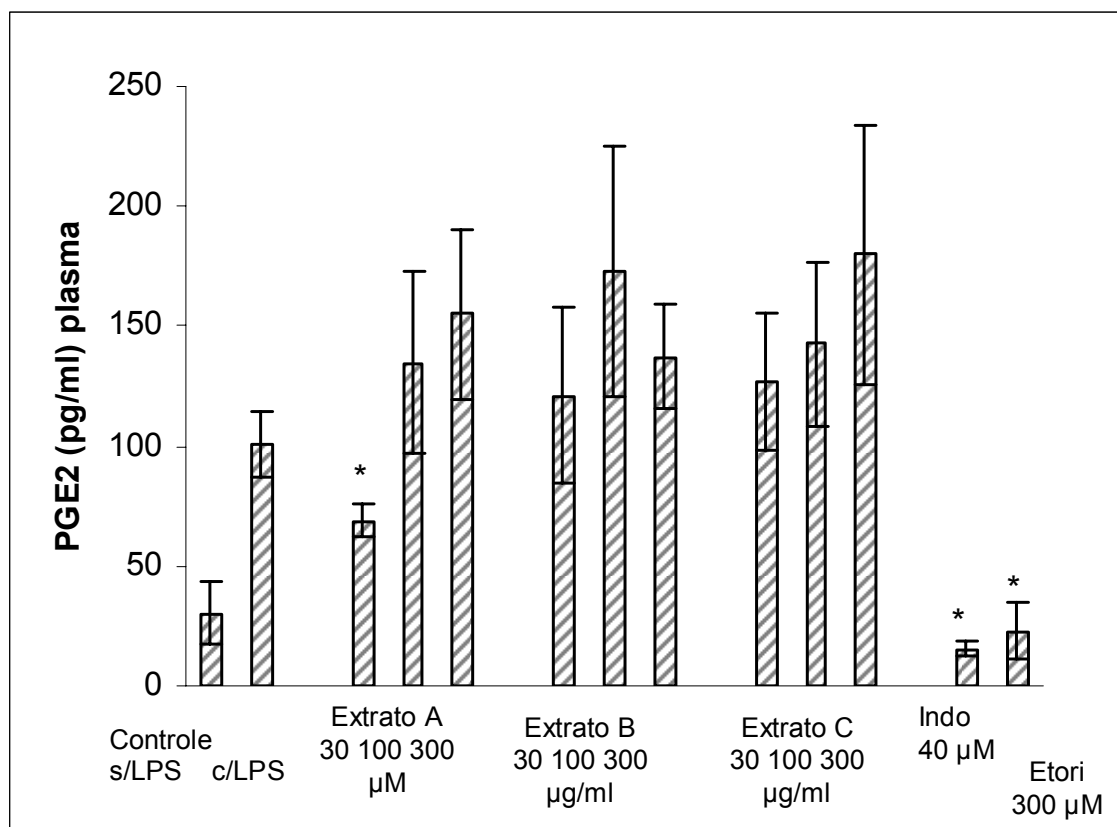


Figura 16 – Atividade da COX-2: Efeito dos extratos A, B e C com diferentes constituintes e quantidades de harpagosideo, indometacina (Indo 40 µM) e etoricoxibe (Etori 300 µM) sobre a produção de PGE₂ em sangue total de voluntários sadios estimulado por LPS (n=4). Os resultados estão expressos em média ± e.p.m. pg/ml de PGE₂ * p<0,05

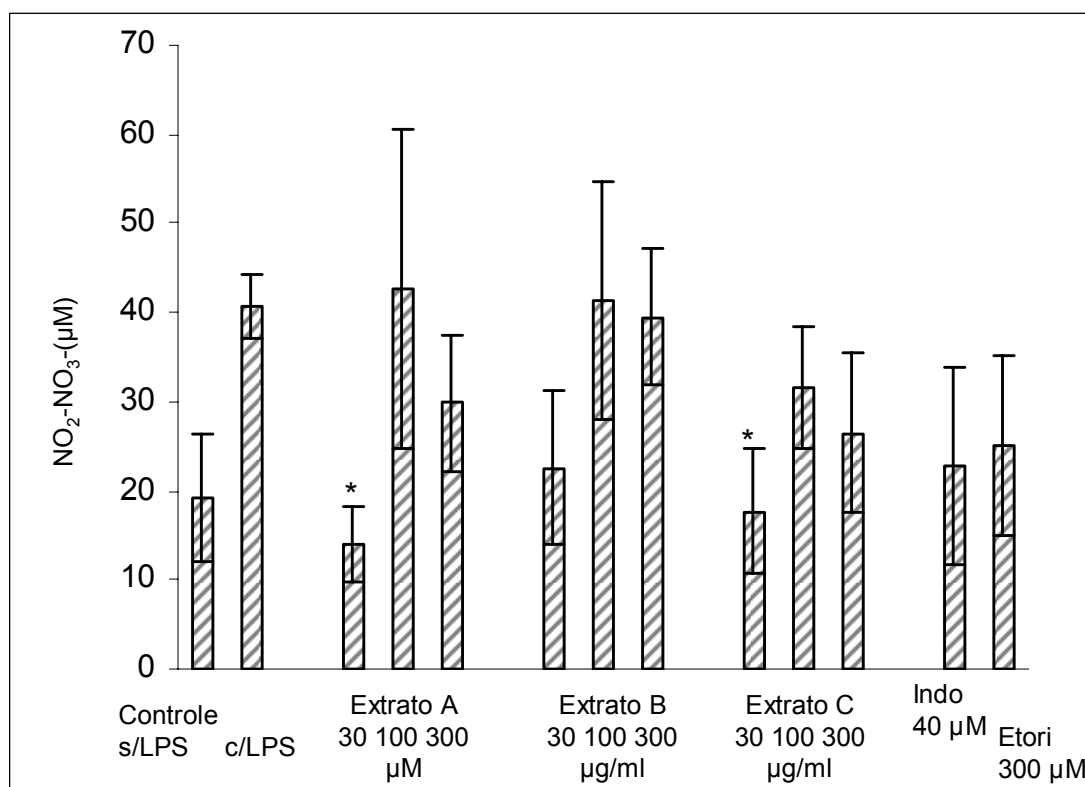


Figura 17 – Efeito dos extratos A, B e C com diferentes constituintes e quantidades de harpagosídeo, indometacina (Indo 40 μM) e etoricoxibe (Etori 300 μM) sobre a produção de NO em sangue total de voluntários sadios estimulado por LPS (n=4). Os resultados estão expressos em média ± e.p.m. μM de NO₂⁻ / NO₃⁻ * p<0,05

5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado com o intuito de estimar a eficácia do extrato de *H. procumbens* sobre as atividades da COX-1 e COX-2 e produção de NO. Para avaliação da ação do extrato bruto e de suas sub-frações sobre essas enzimas, foram realizados ensaios de sangue total nos quais os compostos e suas sub-frações foram testados. Adicionalmente, testes *ex vivo* foram realizados com o sangue de pacientes com OA de coluna lombar, tratados 2 g de extrato seco hidro alcoólico da garra-do-diabo em cápsulas gelatinosas, contendo 35,6 mg do harpagosídeo/dia, por 6 semanas.

Embora não fosse nosso objetivo primário, verificamos uma melhora de 85% no quadro de dor lombar e de outras articulações dessas pacientes submetidas ao tratamento. Esse índice foi ligeiramente superior aos obtidos por Chrubasik^a et al. (2003) (50 a 70%) que utilizaram extrato aquoso de *H. procumbens* contendo 60 mg harpagosídeo/dia. O esquema terapêutico empregado levou a uma melhora de alguns parâmetros clínicos (EVA, DMC e RM), enquanto outros (VHS e HAQ) não foram significativamente alterados. O questionário RM, específico para avaliação de dor lombar, revelou que houve uma melhora de 4,5 pontos no escore, ligeiramente superior à melhora descrita para dores lombares crônicas que é de 3,5 pontos (Chrubasik^b et al., 2003). Uma série de estudos descritos na literatura mostram a eficácia clínica da garra-do-diabo. Em um ensaio comparativo realizado para tratamento de pacientes com OA de joelhos e quadril durante 4 meses com diacireína 100mg/dia ou extrato aquoso de garra-do-diabo na dose de 2,6 g ao dia. A garra-do-diabo foi superior em termos de segurança e comparável à diacireína em eficácia (Chantre et al., 2000). Em outro estudo, a eficácia terapêutica do extrato aquoso de garra-do-diabo (60mg/dia de harpagosídeo / 8 semanas) foi avaliada em 250 pacientes com quadro de OA de joelhos, quadril e dor lombar inespecífica. Utilizando índices como EVA, índice de Arhus e WOMAC, os resultados mostraram uma melhora de 50 a 70% das pacientes (Chrubasik^b et al., 2003).

Em nosso estudo, ensaios *in vitro* foram realizados para verificar um possível efeito direto de concentrações crescentes do extrato bruto, com diferentes quantidades

de harpagosídeo (1,12 a 17,8 µg) sobre as atividades de COX-1 e COX-2. Nenhuma das doses testadas promoveu qualquer alteração na atividade das duas enzimas. A complexidade de um extrato bruto em relação à sua composição química, bem como uma possível ação de metabólitos específicos presentes no extrato pode ter contribuído para esses resultados.

A avaliação dos efeitos dos metabólitos secundários do extrato hidro-alcoólico do *H. procumbens* sobre a síntese dos eicosanóides, TxA_2 e PGE_2 , e a produção de NO foram testadas em sangue total de pacientes antes e após o tratamento com a garra-do-diabo. Verificamos que o tratamento promoveu um aumento da atividade da COX-1, avaliada através do aumento de produção de TXB_2 durante a coagulação, bem como aumento dos níveis basais de PGE_2 (sem estímulo por LPS). É interessante salientar que, no sangue das pacientes tratadas, quando LPS foi adicionado ao ensaio não foi observado um acréscimo na produção de PGE_2 pelos monócitos, sugerindo que a enzima já estivesse em condições de estimulação máxima. Uma outra explicação plausível seria que o extrato, embora aumentasse a atividade basal das enzimas, podem promover uma inativação dos receptores para esse estímulo. Os dados obtidos em nosso trabalho são inéditos, pois os ensaios realizados anteriormente por Loew et al. (2001) em sangue total de voluntários sadios para avaliação na síntese dos eicosanóides, TXB_2 e leucotrienos (LT), não revelaram alteração na produção de TXB_2 . No caso dos estudos realizados por Moussard et al. (1992), também em voluntários sadios, a atividade da COX-2 foi avaliada sem estimulação com LPS, sem refletir, portanto sua atividade.

O aumento da produção de TXB_2 e dos níveis basais de PGE_2 observados em nosso trabalho pode ser decorrente da presença do ácido cinâmico no extrato bruto, que pode estimular a síntese das PGs devido a um aumento da atividade da COX. Robak et al. (1981), em ensaios com diversos compostos fenólicos, como os ácidos cafêico, hidrocaféico, clorogênico e cinâmico, testados na concentração de 1 mM, verificaram aumento da atividade da COX em vesículas seminais de rãs, salientando que todos os derivados do ácido cinâmico (esterificados) foram potentes estimuladores dessa enzima. Uma outra possibilidade seria a regulação sobre fosfolipase A_2 citosólica, com aumento da PGH_2 , e, conseqüentemente, da produção de TXA_2 , e de

PGE₂ indiretamente (Caughey et al., 2001) sem, contudo aumentar a atividade da enzima, COX-2.

Em nosso estudo observamos resultados diferentes nos ensaios *in vitro* e *ex vivo* utilizando o mesmo extrato bruto. No ensaio *ex vivo* foi observado um aumento da atividade da COX-1 e COX-2 (sem LPS) e no ensaio *in vitro* com o mesmo extrato não ocorreu qualquer alteração na atividade dessas enzimas. Essa diferença também foi observada por Loew et al. (2001) entre a concentração de extrato de *H. procumbens* necessária para obtenção dos efeitos inibitórios *in vitro* na formação dos leucotrienos (LT) e aqueles necessários para diminuição dos níveis plasmáticos dos LT em sangue total (*ex vivo*). A farmacocinética do fito-antiinflamatório explicaria esses resultados; o extrato do *H. procumbens* apresenta um ciclo enterohepático e atinge níveis plasmáticos 1h e meia a 3 horas após sua administração, e a sua concentração plasmática depende do caráter lipofílico das suas moléculas.

Na tentativa de melhor esclarecer a ação das diferentes substâncias presentes no extrato bruto sobre a atividade de cada enzima, realizamos testes das diferentes frações isoladas por HPLC e que continham diferentes concentrações de harpagosideo. Nesse ensaio foram utilizados dois controles pareados, indometacina, um inibidor não seletivo da atividade das COXs, e o etoricoxibe, inibidor seletivo da atividade de COX-2, que validaram o ensaio.

Mais uma vez resultados distintos foram verificados quando o extrato bruto foi ingerido (ensaio com as pacientes) e quando testamos as diferentes frações em sangue total. Nos ensaios *ex vivo* ocorreu um aumento da atividade da COX-1 e COX-2, em condições basais, entretanto, sob estimulação nenhum efeito adicional foi verificado. Nos ensaios com as diferentes frações (extratos A, B e C) verificamos uma inibição da atividade da COX-1 em todas as doses (30,100 e 300 µM) do extrato A (88,8% de harpagosideo), sem alteração na atividade da enzima com os demais extratos B e C. Em relação à atividade da COX-2 mais uma vez somente o extrato A, que continha maior concentração de harpagosideo e sem ácido cinâmico na menor dose testada, inibiu também a atividade da COX-2. Especulamos que esse efeito inibitório do extrato A sobre as duas enzimas deve ser decorrente da maior concentração de harpagosideo presente. A discrepância dos resultados *ex vivo* deve

ser devida ao fato de que, após metabolismo, pode haver predomínio da atividade de um outro componente como o iridóide e o ácido cinâmico esterificado ou livre, que possuem isoladamente ações antagônicas. Sendo assim, nos ensaios *ex vivo* parece ter ocorrido um predomínio da atividade do ácido cinâmico com o aumento da produção basal de PG (PGE₂), devido a estimulação das ciclooxigenases (Robak et al., 1981) enquanto que os ensaios com o extrato A parece ter havido predomínio da ação do harpagosídeo.

Nossos resultados estão de acordo aos descritos por Huang et al. (2006), nos quais as células HepG₂ humanas e macrófagos de ratos RAW 264,7 estimuladas com LPS foram incubadas com harpagosídeo em diferentes concentrações, 21 ou 200 µM, e mostraram inibição da atividade da COX-2 e da expressão de NOS nas células HepG₂ com 200µM. A inibição da síntese de ambas as enzimas parece estar relacionada ao efeito modulador sobre a atividade do fator de transcrição NF-κB. Nos estudos realizados por Jang et al., (2003) em fibroblastos, os extratos aquosos da garra-do-diabo inibiram a atividade da COX-2 induzida por LPS e iNOS em concentrações de harpagosídeo maiores que 100 µg/ml.

No sangue total das pacientes após o tratamento com extrato da garra-do-diabo, não foram observadas alterações na produção de NO, entretanto no ensaio com as diferentes frações verificamos um efeito inibitório na produção de NO de igual magnitude (67%) com extrato A (30µM) e com extrato C (30µg/ml). Considerando a quantidade de harpagosídeo presente nos dois extratos, 14,8 µg/ml extrato A e 0,82 µg/ml extrato C, pode ser que a maior concentração do ácido cinâmico livre presente no extrato C atue como um potente anti-oxidante e talvez potencialize a ação do harpagosídeo presente nesse extrato. Em ensaios realizados por Kaszkin et al. (2004), para avaliação da regulação da expressão da iNOS em células mesangiais de rato incubadas com diferentes concentrações de harpagosídeo, extrato com harpagide (sem harpagosídeo por HPLC) e extrato com 30µg/ml de ácido cinâmico esterificado foi observado que somente extratos com alta concentração de harpagosídeo foram eficazes na inibição da indução da iNOS ; o ácido cinâmico na forma esterificada não apresentou efeito inibitório na formação de NO, pelo contrário aumentou sua formação em 30%.

O extrato bruto de *H. procumbens* contém uma mistura heterogênea de iridóides não identificados (frações 5 a 12 obtidas por CCDC). Provavelmente, nessa mistura de iridóides podem existir frações com ação adicionais sobre a síntese dos eicosanóides e a produção de NO diferente da encontrada para o harpagosideo. Uma gama muito grande de outros constituintes mais polares, que não foram separados e/ou identificados, também pode ter contribuído para as ações sobre a atividade da COX-1 e COX-2 e na produção de NO observadas.

Ensaio clínico com os diferentes extratos com diferentes quantidades de harpagosideo para tratamento da OA devem ser realizados para melhor compreensão do mecanismo de ação do fitoterápico e para avaliação dos efeitos sobre os diversos mediadores de inflamação.

6. CONCLUSÕES

- O extrato bruto do *H. procumbens* em concentrações crescentes avaliado *in vitro* em ensaio de sangue total não promoveu qualquer alteração das atividades das enzimas COX-1 e COX-2.
- O uso por 6 semanas do extrato bruto hidro-alcoólico do *H. procumbens* (garra-do-diabo) na dose de 2 g ao dia ,contendo 35,4 mg harpagosideo, mostrou-se eficaz no tratamento da exacerbação da dor em pacientes com OA de coluna lombar.
- A ação dos metabólitos do extrato da garra-do-diabo avaliada no sangue total de pacientes com OA de coluna lombar após o tratamento mostrou aumento da atividade da COX-1 e aumento da atividade da COX-2 sem estimulação com LPS. O tratamento promoveu também redução na capacidade resposta da COX-2 ao estímulo com LPS. Não foram observadas alterações na produção de NO após o tratamento.
- Os diferentes compostos e sub-frações do extrato bruto avaliadas *in vitro* em ensaios de sangue total mostraram que o extrato A, 88,8% de harpagosideo, inibiu a atividade da COX-1 nas 3 doses testadas . O extrato A, 30 μ M, inibiu significativamente a atividade da COX-2. Os demais extratos testados não alteraram a atividade das ciclooxigenases. Em relação à produção de NO, os ensaios *in vitro* mostraram inibição na produção de NO pelos extratos A (30 μ M) e C (30 μ g/ml) em 68 e 66,5%, respectivamente. O composto bioativo, harpagosideo, inibiu as enzimas testadas e deve ser alvo de futuros estudos.

ANEXO 1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N..... SEXO: FEMININO
DATA DE NASCIMENTO.....
ENDEREÇO.....
BAIRRO..... CIDADE.....
CEP..... TELEFONE: DDD.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Efeito 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.
PESQUISADOR: Maria Cecília Cattai Anauate
CARGO/ FUNÇÃO: Médica
UNIDADE DA HCFMUSP: Reumatologia
2. AVALIAÇÃO DO RISCO DE PESQUISA
SEM RISCO: sem probabilidade do indivíduo apresentar qualquer dano com consequência imediata ou tardia do estudo.
3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 ANOS

**III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR PARA A PACIENTE SOBRE A
PESQUISA CONSIGANDO:**

1. Justificativa e os objetos de pesquisa

A Senhora foi escolhida para esse estudo junto com outras dezenove pacientes com osteoartrite de coluna lombar (lombalgia e/ou “bicos de papagaio na coluna”) com o mesmo problema. Esse projeto tem como objetivo verificar os efeitos da garra-do-diabo sobre a dor lombar e sua atuação como antiinflamatório. Esse extrato ainda não tem seu uso terapêutico comprovado sendo esse outro objetivo do estudo. Antes que a Senhora inicie com esse tratamento será necessário que permaneça

15 (quinze dias) sem tomar antiinflamatório, diacireína, estatinas para que seja possível a avaliação a atividade antiinflamatória do extrato. Caso a Senhora sinta dor, o uso de tramadol será permitido, mas é melhor entrar em contato comigo para esclarecer qualquer dúvida.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

É necessária a coleta de 10 ml de sangue de todas as pacientes antes de começar o estudo e seis semanas após o uso do extrato ativo para todos os participantes do estudo.

3. Desconfortos e riscos esperados

Os riscos e desconfortos envolvidos são os mesmos de uma coleta de sangue normal.

4. Benefícios que poderão ser obtidos

Esse estudo não prevê benefícios diretos para a senhora ou outras pacientes participantes, mas poderá ajudar a entender melhor o processo inflamatório e também buscar uma alternativa diferente no tratamento da osteoartrite.

5. Procedimentos alternativos podem ser vantajosos para o indivíduo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE AS GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso a qualquer tempo as informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive dirimir eventuais dúvidas.

A qualquer momento a Senhora e as outras pacientes que estão participando desse estudo tem total liberdade para perguntar, porque é importante para o estudo que siga as orientações e tome o extrato ativo corretamente.

2. Liberdade para retirar o seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuidade da assistência.

A Senhora não têm obrigação nenhuma de contribuir para esse ou qualquer outro estudo e a sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo ao seu atendimento médico.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Em nenhum momento, seu nome será divulgado em publicações, relatórios ou quaisquer meios de comunicação, sendo, portanto o resultado dessa pesquisa, se divulgado, anônimo e confidencial.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Até o momento, não foram relatados casos de efeitos colaterais com o uso desse extrato de garra-do-diabo, mas em caso de necessidade de atendimento, o serviço de Reumatologia disponibilizará assistência ao paciente.

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa

Esse caso não cabe indenização porque o extrato ativo utilizado é isento de efeitos colaterais e não oferece riscos à saúde.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Em caso de dúvida, entrar em contato com:

Dra. Maria Cecília nos telefones: (11) 55610800 e (11)50900443

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado. Consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

São Paulo, 02 de maio de 2006.

Assinatura da paciente participante

Assinatura do pesquisador

ANEXO 3

NOME DA PACIENTE: _____

FITO-TERÁPICO: _____

DOSE: _____

ANTES DO TRATAMENTO

DIA DA COLETA DE SANGUE

DATA ___/___/___

- | | |
|-----------------------------------|------------|
| 1. DOR LOMBAR HOJE ? | SIM OU NÃO |
| 2. OUTRAS DORES ARTICULARES? | SIM OU NÃO |
| 3. ONDE? | |
| 4. NECESSITOU DO USO DE TRAMADOL? | SIM OU NÃO |

APÓS O TRATAMENTO / 6 SEMANAS

DIA DA COLETA DE SANGUE

DATA ___/___/___

- | | |
|--|------------|
| 5. DOR LOMBAR HOJE? | SIM OU NÃO |
| 6. MELHOROU? | SIM OU NÃO |
| 7. OUTRAS DORES ARTICULARES? | SIM OU NÃO |
| 8. MELHOROU ? | SIM OU NÃO |
| 9. ONDE? | |
| 10. NECESSITOU USAR TRAMADOL? | SIM OU NÃO |
| 11. EFEITOS ADVERSOS? | SIM OU NÃO |
| 12. QUAIS? | |
| 13. QUER MANTER A MEDICAÇÃO? | SIM OU NÃO |
| 14. QUER TROCAR? | SIM OU NÃO |
| 15. EM CASO AFIRMATIVO, SERÁ INICIADO TRATAMENTO COM AINH. | |

ANEXO 4**QUESTIONÁRIO – HEALTH ASSESSMENT QUESTIONNAIRE (HAQ)**

NOME: _____ RAÇA: _____ SEXO: FEMININO
 IDADE: _____ DOENÇA: _____ TEMPO DE DOENÇA: _____
 TIPO FUNCIONAL: _____ DATA: ___/___/___ RG: _____

NÍVEL DE DIFICULDADE

Você é capaz de:	sem qualquer	com alguma	com muita	incapaz de fazer
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos sapatos e abotoar suas roupas?	0	1	2	3
2. Lavar sua cabeça e cabelos?	0	1	2	3
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braço?	0	1	2	3
4. Deitar-se e levantar-se da cama?	0	1	2	3
5. Cortar um pedaço de carne?	0	1	2	3
6. Levar à boca um copo ou xícara cheia de café, leite ou água?	0	1	2	3
7. Abrir um saco de leite comum?	0	1	2	3
8. Caminhar em lugares planos?	0	1	2	3
9. Subir 5 degraus?	0	1	2	3
10. Lavar e secar seu corpo após o banho?	0	1	2	3
11. Tomar banho de chuveiro?	0	1	2	3
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	0	1	2	3
13. Levantar os braços e pegar um objeto de Aproximadamente 2,5 kg, que está posicionado pouco acima da cabeça?	0	1	2	3
14. Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	0	1	2	3
15. Segurar-se em pé no ônibus ou metro?	0	1	2	3
16. Abrir potes ou vidros de conservas, que tenham sido previamente abertos?	0	1	2	3
17. Abrir e fechar torneiras?	0	1	2	3
18. Fazer compras nas redondezas onde mora?	0	1	2	3
19. Entrar e sair de um ônibus?	0	1	2	3
20. Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?	0	1	2	3

Escores dos componentes:

Componente 1 , perguntas 1 e 2:

Maior escore = ____

Componente 2 , perguntas 3 e 4:

Maior escore = ____

Componente 3 , perguntas 5,6 e 7:

Maior escore = ____

Componente 4 , perguntas 8 e 9:

Maior escore = ____

Componente 5 , perguntas 10, 11 e 12:

Maior escore = ____

Componente 6 , perguntas 13 e 14:

Maior escore = ____

Componente 7 , perguntas 15,16 e 17:

Maior escore = ____

Componente 8 , perguntas 18, 19 e 20:

Maior escore = ____

Média aritmética dos escores dos componentes:

Escore do HAQ = _____

ANEXO 5

QUESTIONÁRIO DE ROLAND- MORRIS – LOMBALGIA

DATA ____ / ____ / ____

Instruções:

Quando suas costas doem, você pode encontrar dificuldades em fazer algumas coisas que normalmente faz. Esta lista possui algumas frases que as pessoas têm utilizado para se descreverem quanto sentem dores nas costas. Quando você ler essas frases, pode notar que algumas se destacam por descrever você hoje. Ao ler a lista, pense em você hoje. Quando ler uma frase que descreve você hoje, assinale-a. Se a frase não descreve você, então deixe o espaço em branco e siga para a próxima frase.

Assinalar apenas a frase que tiver certeza que descreve você hoje:

Frases:

1. Fico em casa a maior parte do tempo por causa das minhas costas.
2. Mudo de posição frequentemente tentando deixar minhas costas confortáveis.
3. Ando mais devagar que o habitual por causa de minhas costas.
4. Por causa das minhas costas, eu não estou fazendo nenhum dos meus trabalhos que geralmente faço em casa.
5. Por causa das minhas costas, eu uso o corrimão para subir escadas.
6. Por causa das minhas costas, eu me deito para descansar mais frequentemente.
7. Por causa das minhas costas, eu tenho que me apoiar em alguma coisa para me levantar de uma cadeira normal.
8. Por causa das minhas costas, tento conseguir com que as pessoas façam as coisas por mim.
9. Eu me visto mais lentamente que o habitual por causa das minhas costas.
10. Eu somente fico em pé por períodos curtos de tempo por causa das minhas costas.
11. Por causa das minhas costas, eu evito abaixar ou me ajoelhar.
12. Encontro dificuldades em me levantar de uma cadeira por causa das minhas costas.
13. As minhas costas doem quase o tempo todo.
14. Tenho dificuldade em me virar na cama por causa de minhas costas.
15. Meu apetite não é muito bom por causa de minhas dores nas costas.
16. Tenho problemas para colocar minhas meias (meia-calça) por causa das dores em minhas costas.
17. Caminho apenas curtas distâncias por causa de minhas dores nas costas.
18. Não durmo bem por causa das minhas costas.
19. Por causa de minhas dores nas costas, eu me visto com ajuda de outras pessoas.
20. Fico sentado a maior parte do dia por causa de minhas costas.
21. Evito trabalhos pesados em casa por causa de minhas costas.
22. Por causa das dores nas minhas costas, fico mais irritado e mal humorado com as pessoas do que o habitual.
23. Por causa de minhas costas, eu subo escadas mais vagarosamente do que o habitual.
24. Fico na cama a maior parte do tempo por causa de minhas costas.

Score Total (Soma das respostas assinaladas)

ESCALA VISUAL ANALÓGICA DE DOR

Assinale na linha abaixo o local onde você acredita que represente melhor a sua dor nas costas hoje.
O zero representa ausência de dor e dez dor insuportável.

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Sem dor

Dor insuportável

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amin AR, Attur M, Abramson SB. Nitric oxide synthase and cyclooxygenases: distribution, regulation, and intervention in arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 1999; 11:202-9.
2. Andersen ML, Santos EHR, Seabra MLV, Silva AAB, Tufik S. Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 91:325-30.
3. Benito PB, Lanza A M D, Sen A M S, Galindez J S, Matellano L F, Gomes A S and Martinez M J A .Effects of some iridoids from plant origin arachidonic acid metabolism in cellular systems. *Planta Medica* 2000; 66:324, 328.
4. Berenbaum F. Osteoarthritis: epidemiology, pathology and pathogenesis. In: Klipfel JH (ed.).Primer on the Rheumatic Diseases. 12^{ed}. Atlanta: Go Arthritis Foundation 2001:285-9.
5. Biyani A and Andersson GBJ. Lumbalgia: physiopathology and management. *Journal American Academy Orthopedics Surgery* 2004; 12:106-115.
6. Brandt KD. Diagnosis and Nonsurgical Management of Osteoarthritis. Professional Communications, Inc. 3nd ed., 2003.
7. Brien S, George T, Lewith MA , MacGregor G Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens*) as a treatment for Osteoarthritis : a review of efficacy and safety. *The journal of alternative and complementary medicine*.2006; 12 (10): 981-93.
8. Caughey GE, Cleland LG, Gamble JR, James MJ. Up-regulation of endothelial cyclooxygenase -2 and prostanoid synthesis by platelets *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276 (41) Issue of October 12:37839-45.
9. Chaiamnuay S, Allison JJ, Curtis JR. Risk versus benefits of cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal Health System Pharmacology*. 2006 Oct 1; 63 (19): 1837-51. Review.

10. Chantre P, Cappelaere A, Leblan D, Guedon D, Vandemander J, Fournie B. Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine* 2000; 7(3):177-83.
11. Chrubasik^a S, Model A, Black A, Pollak S. A randomized double-blind pilot study comparing Dolofetin and Vioxx in the treatment of low back pain. *Rheumatology* 2003; 42:141-48.
12. Chrubasik JE, Neumann E, Muller-Ladner U, *et al.* Potential molecular basis of chondroprotective of *Harpagophytum procumbens*. Letter to the editor. *Phytomedicine* 2006; 13:598-600.
13. Chrubasik^b S, Thanner J, Kunzel O, Conradt C, Black A, Pollak S. Comparison of outcomes measures during treatment with the proprietary *Harpagophytum* extract Doloteffin in patients with pain in the lower back, knee or hip. *Phytomedicine* 2002. 9:181-94.
14. Clarkson C, Staerk D, Hansen SH, Smith PJ, Jaroszeski JW. Identification of major and minor constituents of *Harpagophytum procumbens* (devil's claw) using HPLC-SPE-NMR and HPLC-ESIMS/ APCIMS. *Journal of Natural Products* 2006; 69: 1280-8.
15. Costa A. Farmacognosia 2002, Vol.3 5^o edição. Fundação Calouste Gulbenkian (Lisboa).
16. Ding AH, Nathan CF, Sturhr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology* 1988; 141(4): 2407-12.
17. European pharmacopoeia, 1997, 3rd Ed vol 1095 pp 716-717. Published in accordance the convention on elaboration of a European pharmacopoeia's (n^o 50) ESCOP Monograph (1997) *Harpagophyti radix*, Fascicule 2, ISBN 1-901964-019.
18. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The Role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002; 39 (1-2):237-46.
19. Fiebich BL, Heinrich M, Hiller KO, Kammerer N. Inhibition of TNF- α synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by *Harpagophytum* extract SteiHap 69. *Phytomedicine* 2001; 8(1):28-30.

20. Gilliam MB, Sherman MP, Griscavage JM, Ignarro IJ. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. *Anal Biochemical* 1993; 212: 359-65.
21. Grom J, Fretto J, Rosen E. O quadril. Exame músculo esquelético. Cap. 11. Porto Alegre, Editora Artmed, 2000: 315.
22. Huang THW, Tran Van H, Duke RK, *et al.* Harpagoside suppress lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF- κ B activation. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 104:149-55.
23. Jang MH, Lim S, Seung-Moo Han, *et al.* , *Harpagophytum procumbens* suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in fibroblast cell line L929. *Journal Pharmacology Science* 2003; 93:367-71.
24. Jones A, Clark A, Freeman BJC, Lam KS, Grevitt MP. The Modic classification inter and intra observer error in clinical practice. *Spine* 2005; 30(16):1867-9.
25. Kang J, Georgescu H I, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson III W F and Evans CH. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinase, nitric oxide, interleukin-6 and prostaglandin E2. *Spine* 1996; 21(3): 271-277.
26. Kaszkin M, Beck KF, Koch E, *et al.* Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of *Harpagophytum procumbens* derives from harpagoside dependent and independent effects. *Phytomedicine* 2004; 11:585-95.
27. Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY , Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264,7 and their structure-activity relationships. *Biological Pharmacology* 1999; 58: 1605-10.
28. Lanhers MC, Fleurentin J, Mortier F, Vinche A, Younos C. Anti-inflammatory and analgesics effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. *Planta Medica* 1992; 58:117-22.
29. Loew D, Mollerfeld J, Schrodter A, Puttkammer S, Kaszkin M. Investigations on the pharmacokinetic properties of *Harpagophytum* extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis *in vitro* and *ex vivo*. *Clinical pharmacology & therapeutics* 2001; 69(5):356-64.

30. Long L, Soeken K, Ernst E. Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology* 2001; 40:779-93.
31. Martin R, Fairbank J. The Roland-Morris disability questionnaire and the Oswestry disability questionnaire. *Spine* 2000; 25(24):3115-3124.
32. Mello SB, Barros DM, Silva AS, Laurindo IM, Novaes GS. Methotrexate as a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor in whole blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2000, 39(5):533-6.
33. Moussard C, Alber D, Toubin MM, Thevenon N, Henry JC. A drug used in traditional medicine, *Harpagophytum procumbens*: no evidence for NSAID-like effects on whole blood eicosanoid production in human. *Prostaglandins leukotriene and essential, fatty acids* 1992; 46:283-86.
34. Patrignani P, Panara MR, Grecco A *et al.* Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxidase synthases. *Journal Pharmacology Experimental Therapy* 1994;217:1705-12.
35. Penglis PS, Cleland LG, Demasi M, Coughy GE, James MJ. Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenases inhibitors. *Journal of Immunology* 2000 Aug 1; 165(3): 1605-11.
36. Qi J, Ji-Jun C, Zhi-Hong C, Jia-Hong Z, Bo-Yang Y e Qui SX. Iridoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw) .*Phytomedicine* 2006; 67: 1372-77.
37. Roback J, Duniec Z, Grodzinska-Zachwieja Z. The influence of some cinnamic acid derivatives on cyclo-oxygenase and lipoxidase activities. *Polinish Journal Pharmacology Pharm.*, 1981 33: 521-25.
38. Salinas G, Rangasetty UC, Uretsky BF, Bimbaum Y. The cyclooxygenase 2 (COX-2) stories: it's time to explain, not inflame. *Journal of cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2007; 12:98-11.
39. Seda H, Seda AC – Osteoartrite – Em Reumatologia Diagnóstico e Tratamento. Caio Moreira e Marco Antonio de Carvalho- 2º Ed. Editora Medsi; 2001: 289 – 307.

40. Setty AR, Sigal LH. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of actions, efficacy, and side effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2005;773-84.
41. Solovieva S, Kouhia S, Leino-Arjas P, Ala-Kokko L, Luoma K. Interleukin 1 polymorphism and intervertebral disc degeneration. *Epidemiology* 2004; Sep; 15 (5): 626-33.
42. Spelman K, Burns JJ, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Reviews* 2006; 11(2): 128-50.
43. Stefanovic- Racic M, Stadler J, Georgescu HI, Evans CH. Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit's synoviocytes. *Journal of Rheumatology*. 1994; 21(10):1892-8.
44. Sthal, E.1969. Thin layer Chromatography. New York: Springer Verlag.
45. Su WY, Day BJ, Kang BH, Crapo JD, Huang YC, Chang Ly. Lung epithelial cell-released nitric oxide protects against PMN-mediated cell injury. *American Journal of Physiology*.1996; 271(4 Pt 1): L 581-6.
46. Tacconelli S, Capone ML, Sciulli MG, Ricciotti E, Patrignani P. The biochemical selectivity of novel cox-2 inhibitors in whole assays of cox-isozyme activity. *Current Medical research and opinions* 2002; 18(8): 503-11.
47. Takahashi H, Suguro T, Okazima Y, Motegi M, Okada Y, Kakiuchi T. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine. *Spine* 1996; 21(15):218-224.
48. Zarate R, Yeoman MM. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinalis* Roscoe. *Journal of Chromatography* 1992; 609:407-13.

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

M.C.C. Anauate¹, L.M.B. Torres² and S.B.V. Mello¹

¹ *Department of Internal Medicine, Rheumatology Division, School of Medicine
University de Sao Paulo, SP Brazil.*

² *Department of Plant Physiology and Biochemistry, Institute of Botany, Sao Paulo, SP
Brazil*

*Corresponding Author:

Address reprint requests to DR. S.B.V.Mello, Rheumatology Division, and Department
of Internal Medicine of School of Medicine of Universidade de São Paulo. Avenida Dr.
Arnaldo, 455, São Paulo, 0124-6903, Brazil. Phone number 55-011-30667200, fax 55-
011- 30667200, e-mail: svmello@usp.br

Short title: devil's claw extracts on COX1 and COX-2 activity.

Abstract

Objective: To evaluate the effects of the extract of *Harpagophytum procumbens* (devil's claw) and its fractions on COX-1 and COX-2 activity and NO production in whole blood assays and to investigate the effect of the treatment with the crude extract of *H. procumbens* in OA patients . **Methods:** The COX-1 and COX-2 activity was quantified as platelet thromboxane B₂ production in blood clotting and as prostaglandin E₂ production in heparinized LPS-stimulated whole blood, respectively (radioimmunoassay). Total NO₂⁻/NO₃⁻ concentration was determined by Griess reaction. *In vitro* assays were performed through incubation of the crude extract and fractions with the whole blood from healthy volunteers. Positive controls of the inhibition of COX-1 and COX-2 activity were indomethacin and etoricoxib, respectively. Before and after treating twenty lumbar spine OA patients with crude hydro alcoholic extract of devil's claw (2g / day/ 6 weeks), containing 35.6 mg of harpagoside, COX-1 and COX-2 activity and NO production were evaluated in the patients' whole blood. **Results:** The treatment with devil's claw extracts promoted clinical improvement in OA patients and increased the activity of COX-1 and the basal activity of COX-2, without LPS stimulation. Interestingly, no further increase of this activity was observed when LPS was added in the assay. The *in vitro* assays with the crude extract did not show effects on either enzyme. On the other hand, all tested doses of extract A, with 88.8% of harpagoside, inhibited COX-1 activity. Extract B, the most impure fraction (56.1% of harpagoside and iridoid poll) as well as extract C (2.4% of harpagoside and 86.8% of free cinnamic acid) did not alter COX-1 activity. The lowest concentration of extract A also inhibited COX-2 activity and NO production, whereas extract C (30µg/ml) inhibited only NO production. The controls, indomethacin and etoricoxib, did not alter NO production. **CONCLUSION:** Devil's claw promoted

clinical improvement in OA patients, and simultaneously decreased the COX-2 ability to act in response to LPS. Its bioactive substance, harpagoside, is able to inhibit COX-1 and COX-2 activity and NO production and must be the focus of specific studies.

Key words: Osteoarthritis, Cyclooxygenase, Nitric oxide, *Harpagophytum Procumbens*, Harpagoside, *ex vivo*, *in vitro*

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a progressive disorder caused by unbalanced cartilage degradation-repair processes in areas of major stress resulting in pain, stiffness, and limitation of functions and decrease of life quality (Long *et al.*, 2001). OA is the most common of all rheumatic disorders and like other chronic diseases, its treatment involves complementary and alternative therapies, in addition to drugs, exercises and rehabilitation procedures (Setty & Sigal, 2005).

The extract of *Harpagophytum procumbens* (Burchell De Candolle) Ex Meissn (Pedaliaceae) (devil's claw) is an herbal medicine used to treat OA patients (Chantre *et al.*, 2000)(Chrubasik^a *et al.*, 2003)(Chrubasik^b *et al.*, 2003). This perennial plant grows mainly in Africa, especially in Namibia Steppes and the Kalahari Desert. Clinical evidence in trials and comparative studies against anti-inflammatory drugs, like rofecoxib, and disease-modifying drugs, like diacerrhein, (Chantre *et al.*, 2000) (Chrubasik^a *et al.*, 2003), showed that the root powder and aqueous extract containing at least 50 mg of harpagoside in daily dosage decreased the pain of OA patients (Chrubasik^a *et al.*, 2003). Extracts of *H. procumbens* (devil's claw) promoted significant reduction in pain and inflammation induced by different stimuli in experimental arthritis including Freund's adjuvant-induced arthritis and carragenan-induced rat's paw edema (Lanhers *et al.*, 1992) (Andersen *et al.*, 2004). Devil's claw aqueous extracts inhibited the lipopolysaccharide (LPS) stimulated expression of COX-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in rats' fibroblast cell line (Jang *et al.*, 2003), and also inhibited the LPS-induced release of cytokines (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) and prostaglandin (PG) E₂ from human monocytes (Fiebich *et al.*, 2001). Harpagoside inhibited COX-2 activity and NOS expression in LPS-treated human HepG2 hepatocarcinoma cells and RAW 264.7 macrophage cell lines through its modulator effect on transcription factor NF- κ B

activity. However, no inhibition of the COX-1 enzyme activity was verified (Huang *et al.*, 2006). In rats' renal mesangial cells, devil's claw extracts suppressed nitrite formation due to the inhibition of iNOS expression at transcriptional level (Kaszkin *et al.*, 2004).

Evidence shows that the extracts of devil's claw have as many mechanisms of action as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) because they interact with both the cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) as well as with the release of cytokines and production of nitric oxide (NO) (Spelman *et al.*, 2006). Harpagoside is the first isolated iridoid from devil's claw and is considered as responsible for many of its therapeutic effects, especially on eicosanoid production. The suppression of the synthesis of inflammatory proteins COX-2 and NOS by harpagoside could explain, at least in part, the effectiveness of devil's claw used in the treatment of pain in other inflammatory conditions (Huang *et al.*, 2006).

To evaluate the effect of devil's claw on COX-1 and COX-2 activity (Moussard *et al.*, 1992) and eicosanoids synthesis (Cys-LT and TXB₂) and learn about its pharmacokinetic proprieties, assays (Loew *et al.*, 2001) were performed in the whole blood of healthy volunteers. The authors did not find alterations on eicosanoids synthesis (PGE₂ and TXB₂). The methodology applied did not reflect the COX-2 activity because it was performed without LPS stimulation (Moussard *et al.*, 1992).

Consequently, the exact mechanisms of its actions as well as its active principles responsible for the clinical effect are not yet fully understood. Therefore, the present study aimed to evaluate, in whole blood assays, the influence of the dried hydro-alcoholic crude extract of devil's claw on COX-1 and COX-2 activity as well as the possible action of the extract metabolites on these enzymes activities in lumbar spine OA patients, treated with doses of 2g /day containing 35.6 mg of harpagoside and to

investigate the importance of the different constituents of the crude extract on the of the enzymes activity and NO production.

Patients and methods

Plant Material

The dried hydro alcoholic crude extract of *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. Ex Meissn. (Pedaliaceae) (Devil's claw), containing 1.78% of harpagoside was used in the *in vitro* assays: 1mg of the crude extract was dissolved in 1ml of distilled water and diluted in five different concentrations, ranging from 1.12 to 17.8 µg of harpagoside.

Fractionation of devil's claw extract

The hydro alcoholic crude extract of *H. procumbens* (26g) was fractioned through the normal phase silica bed using the short vacuum chromatographic method (Zarate *et al.*, 1992). Thin-layer chromatography (TLC) (Wagner & Bladt, 1996) was performed on silica gel sheets previously coated with CHCl₃: MeOH (75:25 v/v) in order to fully separate iridoid glycosides, mostly harpagoside (Huang *et al.*, 2006). Iridoid detection was performed with sulfuric acid/vanillin reagent and quantitative high performance liquid chromatography (HPLC) was carried out for the classification of different fractions of iridoids according to Chantre *et al.* (2000). Some of these fractions were used for *in vitro* assays described as extract A, containing 88.8% of harpagoside. Extract B was formed with all fractions of iridoids present in the crude extract, containing 56.14% of harpagoside and 25.77% of cinnamic acid concentrations. Extract C has the smallest concentration of harpagoside (2.74%) and 85.6% of free cinnamic acid confirmed by quantitative HPLC. The different fractions of devil's claw, extracts A, B and C, were analyzed by high-field MRI (Clarkson *et al.*, 2006).

Patient selection

We selected 20 female patients with lumbar spine OA, aged 58.23 years (range 44 – 69 years), according to Chrubasik *et al.* (2003) protocol, adapted and modified. Clinical criteria for inclusion were at least 6 months of susceptibility to low back pain, not attributable to any specific cause such as disc prolapse, hip pain or inflammatory arthritis, and a current exacerbation of complaints lasting for at least 8 weeks, affecting both rest and movement, and causing pain of 5 to 10 on a visual analogue scale (VAS) and judged likely by the investigator to require symptomatic treatment for 6 weeks. The exclusion criteria comprised frequently used generic and specific symptoms such as severe organic illnesses affecting any organ system or progressive neurological deficits in the lower extremities that might indicate cauda equine syndrome (Chrubasik^a *et al.*, 2003).

The Committee for Human Ethics of the University of Sao Paulo approved the protocol for studies in the Rheumatology Division of the School of Medicine, Sao Paulo, SP, Brazil.

No patient received concomitant therapy with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) or glucocorticoids, diacerhein, chondroprotective drugs (e.g. chondroitin and glucosamine sulphate) or anti-cholesterol medicine in the 2 weeks prior to the study. Patients were allowed to take Tramadol 50 mg/day as the only rescue medication (Chrubasik^a *et al.*, 2003) (Malonne *et al.*, 2005).

All patients were evaluated through clinical and laboratorial tests such as erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C- reactive protein (CRP), performed just before and after the treatment. The outcome was evaluated according to changes (I) in the baseline in an established health assessment questionnaire (HAQ) (Chrubasik *et al.*, 2002), (II) in the Roland-Morris disability questionnaire (RM) (Martin & Fairbank., 2000),

(III) in the distance hand-floor (Grom *et al.*, 2000) (IV) in a visual analogue scale (VAS) of pain (Chrubasik *et al.*, 2002), and (V) in a questionnaire for patient's global assessment of the treatment effectiveness (Ostelo *et al.*, 2005). Before the treatment, all patients underwent lumbar spine x-ray and MRI for Modic classification (Jones *et al.*, 2005). The Thomas Test was performed to discard hip disability (Grom *et al.*, 2000). After patients themselves filled out the questionnaires, they were examined and had their blood collected and then they received tablets of devil's claw in the dose of 2g a day of the extract, containing 35.6 mg of harpagoside, to be taken during the 6-week treatment (Chrubasik^a *et al.*, 2003). After this period, patients answered the same questionnaires, underwent the examinations and had their blood collected for *ex vivo* assay.

In Vitro assays

Measurement of COX-1 activity in human whole blood

Normal human blood was collected with no anticoagulant, and 500 μ l was immediately added to tubes containing 10 μ l dose test each. The tubes were mixed and placed in an incubator at 37°C for 60 min, serum was separated by centrifugation (10 min at 3000 rpm) and 100 μ l was removed and added to 400 μ l methanol. After other centrifugation, supernatant was kept at -70°C until assayed for thromboxane B₂ (TxB₂) (Patrignani *et al.*, 1994) (Mello *et al.*, 2000).

Measurement of COX-2 activity in human whole blood

Normal human blood was collected with no anticoagulant and 500 μ l was immediately added to tubes containing a 10 μ l dose of test extracts (described above), heparin (10 UI/ml) and LPS 100 μ g/ml each. To assess the basal activity of the

enzyme, control tubes were incubated in saline solution, with and without LPS. The tubes were mixed and placed in an incubator at 37°C for 24 h. Plasma was separated, and PGE₂ extracted and quantified by the same procedure as that described for thromboxane B₂ (TxB₂) (Patrignani *et al.*,1994) (Mello *et al.*,2000).

Total NO₂⁻/NO₃⁻ determination

The measurement of NO production under LPS (100µg/ml) stimulation was estimated through the total NO₂⁻/NO₃⁻ concentrations in the plasma determined by the colorimetric Griess reaction for nitrite (Ding *et al.*,1988) followed by nitrate reductase-mediated nitrate ion reduction (Gillian *et al.*,1993). The absorbance of the chromophore was read at 504 nm and under these conditions, the method had sensitivity of 30 pmol for each anion.

Ex vivo assay

Aliquots (5ml) of peripheral whole blood for measurement of COX-1 and COX-2 activity and NO production were collected from 20 patients with OA before and after treatment. All steps for the measurement of COX-1 and COX-2 activity and NO production were carried out as described above.

Test with the crude extract

The hydro alcoholic crude extract was dissolved in water as described above and 10µl of each concentration was added to the vials. The final concentrations of *H. procumbens* extract in the assay were 0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 µg. It is important to note that these concentrations represent crescent doses of crude extract, from 1.12 to

17.8 µg of harpagoside. All concentrations were tested *in vitro* in whole blood from five healthy donors who did not take NSAIDs for at least two weeks before donating blood.

Test of fractions of devil's claw

Human whole blood for measurement of COX-1 and COX-2 activity and NO production was collected from four healthy female donors. Extracts previously prepared from *H. procumbens* as described above (10 µl of each solution) were added to the vials. The final concentrations of *H. procumbens* in the assay were: extract A (88.8% harpagoside) - dose 1 (30 µM), dose 2 (100 µM) and dose 3 (300 µM) and extract B (poll of iridoids 56.1% harpagoside + 25.8% cinnamic acid) and extract C (2.7% harpagoside + 85.6% free cinnamic acid) - dose 1 (30 µg/ml), dose 2 (100 µg/ml) and dose 3 (300µg/ml) each.

Positive controls of inhibition of COX-1 and COX-2 activity were performed with indomethacin (40µM) and etoricoxib (300 µM) (Taconelli *et al*, 2002). The assays for COX-1 and COX-2 activity and NO production were performed as described above.

Analyses of TXB₂ and PGE₂

Concentrations of PGE₂ and TXB₂ were measured by radioimmunoassay using commercial kits: PGE₂ [¹²⁵I] and TxB₂ [¹²⁵I] biotrak assays with magnetic separation from Amersham Biosciences UK Limited 2002.

Statistical analysis

Results of non parametric values were expressed as median (range). Within-group comparisons were analyzed by Student's test when normal distribution was detected. For the analyzed measures, $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Clinical features

Some of the casuistic of the 20 lumbar spine OA patients who participated in the study is listed on table 1. The OA was confirmed by MRI and 98% were type II in Modic classification (Jones *et al.*, 2005). The median duration of the disease was 8.5 years (2–20). Although allowed, no patients needed tramadol. Adverse effects occurred in three patients who reported mild gastrointestinal upset.

In vitro effects of the hydro alcoholic crude extract of devil's claw on COX-1 and COX-2 activity

The effects of co-incubation of crescent doses of hydro alcoholic crude extract of devil's claw on COX-1 and COX-2 activity were quantified by measuring TxB_2 and PGE_2 in whole blood stimulated with LPS. The results presented in Figure 1 are expressed as the % of inhibition related to values obtained in the same whole blood incubated in saline solution and stimulated with LPS. Data showed no direct action of the crude extract of devil's claw on COX-1 and COX-2 activity.

Ex vivo assays in whole blood for evaluation of COX-1 and COX-2 activity and NO production

In order to investigate a possible effect of the extract metabolites on COX-1 and COX-2 activity and NO production, 20 lumbar spine OA patients were treated with 2g of devil's claw (35.6mg of harpagoside) daily, for 6 weeks. The results of the *ex vivo*

assay performed with the patients' whole blood before and after treatment are presented in Figure 2. Our results show that the use of devil's claw promoted an increase in COX-1 activity (Figure 2 - panel A 16.50 (3.1- 80) pg/ml versus 32.30 pg/ml (5.2-115) of TxB_2 $p=0,037$). Figure 2 - panel B shows the production of PGE_2 as a result of COX-2 activity. It is important to note that the basal production (without LPS) of the eicosanoid was affected by the treatment (12.20pg/ml (2.5-70) versus 41.00 pg/ml (3.0-210), $p=0,004$). However, under stimulation with LPS after the treatment, there was no increase in COX-2 activity. The nitric oxide production stimulated or not with LPS, was not affected by the treatment (data not shown).

Test in fractions of devil's claw

The assay was performed with normal human blood to evaluate the effect of the fractions with different constituents and harpagoside concentrations. The *in vitro* effects of the devil's claw fractions (extracts A, B and C) on COX-1 and COX-2 activity and NO production were evaluated by measuring TxB_2 and PGE_2 and $\text{NO}^{-2}/\text{NO}^{-3}$ in the whole blood of healthy volunteers. Indomethacin and etoricoxib were used as positive controls of COX-1 and COX-2 inhibition, respectively.

The results of *in vitro* assays showed direct action of extract A, in all doses, and indomethacin on COX-1 activity when compared with the TxB_2 control incubated in saline solution. The other extracts and etoricoxib, on the contrary, did not alter its activity (Figure 3).

The results showed in Figure 4 indicate inhibition of COX-2 activity when incubated with extract A, (30 μM) and the positive controls (indomethacin and etoricoxib) compared with the control production of PGE_2 stimulated with LPS, incubated in saline solution.

The results of the *in vitro* assays on NO production are presented in Figure 5. The data showed reduction of NO production in whole blood stimulated with LPS and incubated in extracts A (30 µM) and C (30µg/ml) in the lowest doses and when compared with the control NO production (stimulated with LPS and incubated in saline solution). The other extracts and positive controls did not affect NO production.

Conclusions

The present study was delineated to evaluate the efficacy of extract of *H. procumbens* on COX-1 and COX-2 activity and NO production. The action of the crude extract and its fractions on these enzymatic activities were evaluated in whole blood assays where the constituents were tested *in vitro*. In addition, *ex vivo* assays were performed with the whole blood of 20 lumbar spine OA patients treated with hydro alcoholic extract of devil's claw, (2g/day/six weeks), containing 35.60 mg of harpagoside, the main active principle of the tested substance. The crude extract of *H. procumbens* contained the percentage of harpagoside (1.78%), recommended for the treatment (range 1.1 - 3%), described in the European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) monograph (1997). However, the clinical trial was not the primary purpose of this study. The patients referred 85% of improvement in their low back pain and it was observed amelioration in clinical parameters such as, VAS and RM. However, HAQ and ESR did not show any significant alteration.

In our study, *in vitro* assays were performed to verify the direct action of crude extract of *H. procumbens* from 1.1 to 17.8 µg of harpagoside on COX-1 and COX-2 activity. None of the tested doses affected their activity directly. The complexity and the

possible presence of special metabolites in the crude extract may contribute to these results.

The evaluation of the metabolite effects of the hydro alcoholic crude extract of devil's claw on the eicosanoids synthesis, TXB₂ and PGE₂, and NO production was performed using whole blood from patients before and after treatment with devil's claw. Our results show basically three points: a) the treatment promoted an increase in the COX-1 activity, b) the basal production (non stimulated) of PGE₂ was enhanced in consequence of the treatment and c) when LPS was added no increase in COX-2 activity was observed. The increase of COX-1 activity and COX-2 basal activity without LPS stimulation after treatment can be attributed to the presence of cinammic acid in the crude extract which stimulated the synthesis of PG, increasing the COX activities (Robak *et al.*, 1981). Besides, that can be explained first by the fact that some metabolites of the crude extract can up regulate the release of c-phospholipase A₂ (Sales *et al.*, 2002) resulting in an increase of aradonic acid and second by the action of TxB₂ in a paracrine way (Caughey *et al.*, 2001), resulting in PGE₂ increase.

These results contrast with those reported by Moussard *et al.* (1992) using blood from normal donors under clotting. They employed 3% of iridoid glycosides for 21 days and did not observe any action of the crude extract on the eicosanoid productions. However, they did not evaluate the COX-2 activity under LPS stimulation.

Our study showed the discrepancy between the results of *in vitro* and *ex vivo* assays with the same crude extract. In the *ex vivo* assays an increase of COX-1 and COX-2 activity (without LPS) was observed and the crude extract did not alter the enzymatic activity in the *in vitro* assays. This discrepancy can be explained by Loew *et al.*, (2001) that demonstrated the difference between the concentration of devil's claw extract

needed for inhibiting *in vitro* leucotrien formation and for decreasing the plasmatic levels of the same eicosanoids in whole blood (*ex vivo*).

Part of the devil's claw action mechanism is usually attributed to the inhibition of the activity of COX. To clarify the participation of the components of devil's claw in the results obtained in the OA patients, we fractionated the crude extract using HPLC methods. Three fractions of the crude extract containing different compositions and concentrations of harpagoside (A, B and C) were incubated *in vitro* with normal blood to evaluate their action on COX-1 and COX-2 activity and NO production. The two positive controls were used for validation of the *in vitro* assay. Indomethacin (40 μM) was used as non-selective COXs inhibitor and etoricoxib (300 μM) as a COX-2 inhibitor.

The results showed differences when the extract was ingested (*ex vivo* assays) and when the different fractions were tested in whole blood. In the *ex vivo* assays an increase in COX-1 and COX-2 (without LPS) activity occurred. However, under LPS stimulation, no additional effect was observed on COX-2 activity. The *in vitro* assays with different fractions (extract A, B and C) showed inhibition of COX-1 activity when the whole blood was incubated with extract A (88.8% harpagoside) in all doses. Regarding PGE₂ production, our results showed significant reduction of COX-2 activity only with 30 μM of extract A (88.8% harpagoside). In the *ex vivo* assays we observed the predominant action of cinammic acid which promotes an increase of PG production and in the *in vivo* assays we observed the predominant action of the iridoid, harpagoside, which inhibits COX-1 and COX-2 activity. Together these results support the concept that the efficacy of botanical drugs is a result of the synergistic and antagonistic action of multiple compounds (Spelman *et al.*, 2006).

The treatment with devil's claw did not alter NO production in the whole blood of patients. The inhibition of NO production was observed when the whole blood of healthy donors was incubated with extract A (30 μ M) and extract C (30 μ g/ml). Extract C in a special composition with free cinnamic acid reduced NO production in 67% suggesting that this fraction with the lowest concentration of harpagoside may have developed this activity due to the presence of cinnamic acid which acts as a powerful anti-oxidant and enhances the harpagoside action (Kaszkin *et al.*, 2004).

Devil's claw promoted clinical improvement in OA patients and simultaneously promoted a decrease in the COX-2 ability to response to LPS. The bioactive substance, harpagoside, is able to inhibit the COX-1 and COX-2 activity and NO production and must be the focus of specific studies.

Acknowledgments

Acknowledgements: The authors thank Maria de Fátima de Almeida and Maria Aurora Gomes da Silva for technical assistance. This work was supported by FAPESP grant # 04/02452-7

References

1. Andersen ML, Santos EHR, Seabra MLV, Silva AAB, Tufik S. Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 91:325-30.
2. Caughey GE, Cleland LG, Gamble JR, James MJ. Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets. *Journal Biological Chemistry* 2001; 276 (41) Oct 12: 37839-45.
3. Chantre P, Cappelaere A, Leblan D, Guedon D , Vandemander J ,Fournie B. Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine* 2000; 7(3):177-83.
4. Chrubasik^a S, Model A, Black A, Pollak S. A randomized double-blind pilot study comparing Dolofetin and Vioxx in the treatment of low back pain. *Rheumatology* 2003; 42:141-48.
5. Chrubasik^b S, Conradt C and Black A. The quality of clinical trails with *Harpagophytum procumbens*. *Phytomedicine* 2003; 10:613-23.
6. Chrubasik S., Conradt C, Roufogalis BD .Effectiveness of *Harpagophytum* extracts and clinical efficacy. *Phytotherapy research* 2004; 18(2):187-89.
7. Chrubasik JE, Neumann E, Muller-Ladner U, *et al.* Potential molecular basis of chondroprotective of *Harpagophytum procumbens*. Letter to the editor. *Phytomedicine* 2006; 13:598-600.
8. Chrubasik S, Thanner J, Kunzel O, Conradt C, Black A , Pollak S. Comparison of outcomes measures during treatment with the proprietary *Harpagophytum* extract Doloteffin in patients with pain in the lower back, knee or hip. *Phytomedicine* 2002. 9:181-94.

9. Clarkson C, Staerk D, Hansen SH, Smith PJ, Jaroszeski JW. Identification of major and minor constituents of *Harpagophytum procumbens* (devil's claw) using HPLC-SPE-NMR and HPLC-ESIMS/ APCIMS. *Journal of Natural Products* 2006; 69: 1280-8.
10. Ding AH, Nathan CF, Sturhr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology* 1988; 141(4): 2407-12. Fiebich BL, Heinrich M, Hiller KO, Kammerer N. Inhibition of TNF- α synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by *Harpagophytum* extract SteiHap 69. *Phytomedicine* 2001; 8(1):28-30.
11. European Pharmacopeia's, 1997, 3rd Ed vol 1095 pp 716-717. Published in accordance the convention on elaboration of a European pharmacopeia's (n^o 50) ESCOP Monograph (1997) *Harpagophyti radix*, Fascicule 2, ISBN 1-901964-019.
12. Gilliam MB, Sherman MP, Griscavage JM, Ignarro IJ. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. *Anal Biochemical* 1993; 212: 359-65.
13. Grom J, Fretto J, Rosen E. O quadril. Exame músculo esquelético. Cap. 11. Porto Alegre, Editora Artmed, 2000: 315.
14. Huang THW, Tran Van H, Duke RK, *et al.* Harpagoside suppress lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF- κ B activation. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 104:149-55.
15. Jang MH, Lim S, Seung-Moo Han, *et al.*, *Harpagophytum procumbens* suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in fibroblast cell line L929. *Journal Pharmacology Science* 2003; 93:367-71.

16. Jones A, Clark A, Freeman BJC, Lam KS, Grevitt MP. The Modic classification inter and intra observer error in clinical practice *Spine* 2005; 30(16):1867-9.
17. Kaszkin M, Beck KF, Koch E, *et al.* Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of *Harpagophytum procumbens* derives from harpagoside dependent and independent effects. *Phytomedicine* 2004; 11:585-95.
18. Lanhers MC, Fleurentin J, Mortier F, Vinche A, Younos C. Anti-inflammatory and analgesics effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. *Planta Medica* 1992; 58:117-22.
19. Loew D, Mollerfeld J, Schrodter A, Puttkammer S, Kaszkin M. Investigations on the pharmacokinetic properties of *Harpagophytum* extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis *in vitro* and *ex vivo*. *Clinical pharmacology & therapeutics* 2001; 69(5):356-64.
20. Long L, Soeken K, Ernst E. Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology* 2001; 40:779-93.
21. Malonne H, Coffiner M, Fontaine D, *et al.* Long-term tolerability of tramadol LP, a new once-daily formulation in patients with osteoarthritis or low back pain. *Journal of Clinical pharmacy and therapeutics*. 2005; 30:113-20.
22. Martin R, Fairbank J. The Roland-Morris disability questionnaire and the Oswestry disability questionnaire. *Spine* 2000; 25(24):3115-3124.
23. Mello SB, Barros DM, Silva AS, Laurindo IM, Novaes GS. Methotrexate as a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor in whole blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2000, 39(5):533-6.
24. Moussard C, Alber D, Toubin MM, Thevenon N, Henry JC. A drug used in traditional medicine, *Harpagophytum procumbens*: no evidence for NSAID-like

effects on whole blood eicosanoid production in human. Prostaglandins leukotriene and essential, fatty acids 1992; 46:283-86.

25. Ostelo RWJG, Henrica CW de Vet. Clinically important outcomes in low back pain. Best practice & research clinical rheumatology 2005; 19(4):593-607.
26. Patrignani P, Panara MR, Grecco A *et al.* Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxidase synthases. Journal Pharmacology Experimental Therapy 1994;217:1705-12.
27. Qi J, Ji-Jun C, Zhi-Hong C, Jia-Hong Z, Bo-Yang Y and Qiu SX. Iridoids glycosides from *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw). Phytomedicine 2006; 67: 1372-77.
28. Roback J, Duniec Z, Grodzinska-Zachwieja Z. The influence of some cinnamic acid derivatives on cyclo-oxygenase and lipoxidase activities. Polish Journal Pharmacology Pharm., 1981 33: 521-25.
29. Sales KJ, Katz AA, Howard B, Soeters RP, Millar RP and Jabbour HN. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin E receptors and angiogenic factors by cyclooxygenase-1 Cancer Research, 2002 January 15; 62(5): 424-32.
30. Setty AR, Sigal LH. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of actions, efficacy, and side effects. Seminars in Arthritis and Rheumatism 2005:773-84.
31. Spelman K, Burns JJ, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. Alternative Medicine Reviews 2006; 11(2): 128-50.

32. Tacconelli S, Capone ML, Sciulli MG, Ricciotti E, Patrignani P. The biochemical selectivity of novel cox-2 inhibitors in whole assays of cox-isozyme activity. *Current Medical research and opinions* 2002; 18(8): 503-11.
33. Zarate R, Yeoman MM. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinalis* Roscoe. *Journal of Chromatography* 1992; 609:407-13.
34. Wagner H, Bladt S. Zgainsk EM *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas* 2th Berlin; Springer Verlag.1996: 303 Germany.
35. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 2001 8: 401-9.

TABLE 1: Baseline demographic and clinical characteristics of the patients at the beginning of the study

<i>Physical characteristics</i>	Median (range)
Age (years)	58 (44–69)
Weight (Kg)	70 (52–100)
Height (m)	1.50 (1.45–1.70)
Body mass index (kg/m ²)	26.79 (20.79–36.38)
Disease duration (yrs)	8.5 (2–20)
Less than 8-year pain (%)	40
Fibromyalgia (%)	55
Modic - classification (II) (%)	98

TABLE 2. Clinical evaluation of 20 OA patients before and after 6 weeks of treatment with (2000 mg/day) of devil's claw

Clinical Parameters	Before treatment	After treatment	P
ESR (mm/h)	13.50 (3.00–49.00)	10.00 (2.00-51.00)	0.153
VAS mm (0-100)	60.00 (50.00-80.00)	35.00 (0.00-90.00)	0.001*
Distance hand-floor (cm)	13.5 (0.00-36.00)	8.00 (0.00-21.00)	0.030*
HAQ DI score (0-3)	0.75 (0.13-1.50)	0.44 (0.00-1.75)	0.063
R-M score (0-24)	9.00 (2.00-20.0)	4.50 (0.00-19.00)	0.005*

Median (range). ESR: Erythrocyte Sedimentation Rate; VAS: Visual Analogue Scale; HAQ DI: Health Assessment Questionnaire Disability Index; R-M: Roland Morris Disability Questionnaire.

*<0.05 by paired t test between values obtained before and after treatment

LEGEND FOR FIGURES

Fig.1. Effect of crescent doses of crude extract of devil's claw in *in vitro* assay. Results are expressed as percentage of inhibition of PGE₂ production (bars) in comparison with control values of normal whole blood stimulated with LPS for 24 h as a reflection of COX-2 activity on monocytes. Percentage of inhibition of TxB₂ in whole blood incubated for 1 h as an indicator of COX-1 activity is represented by the line.

Fig.2. Panel A shows the activity of COX-1 in patients' whole blood before and after a 6-week treatment with an extract of devil's claw (2g extract/ day containing 35.60 mg harpagoside), * p<0.05 between before and after treatment. Panel B represents the activity of COX-2 in patients' whole blood under the same treatment. The box plot is the representation of the production of PGE₂ before and 6 weeks after treatment with and without stimulation with LPS, # p <0.05 by comparison of values with and without stimulation.

Fig.3. COX-1 activity: Effect of extracts A, B and C with different constituents and concentrations of harpagoside, indomethacin (indo 40uM) and etoricoxib (etori 300uM) on TXB₂ production in whole blood of healthy volunteers (n=6). Values are expressed in mean pg/ml of TXB₂ ± S.E.M. * p< 0.05.

Fig.4. COX-2 activity: Effect of extracts A, B and C with different constituents and concentrations of harpagoside, indomethacin (indo 40uM) and etoricoxib (etori 300uM) on PGE₂ production in LPS-stimulated whole blood of healthy volunteers (n=4). Values are mean pg/ml of PGE₂ ± S.E.M. * p< 0.05.

Fig.5. NO production: Effect of extracts A, B and C with different constituents and concentrations of harpagoside, indomethacin (indo 40uM) and etoricoxib (etori 300uM)

on NO production in LPS-stimulated whole blood of healthy volunteers (n=4) Values are mean μM of $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^- \pm \text{S.E.M.}$ * $p < 0.05$.

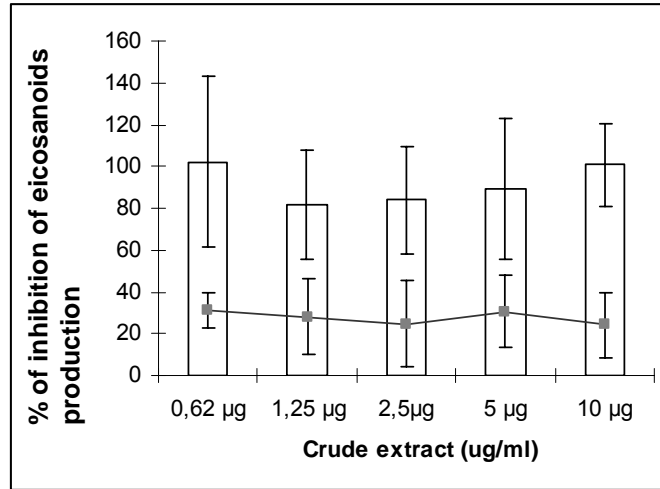


Figure 1

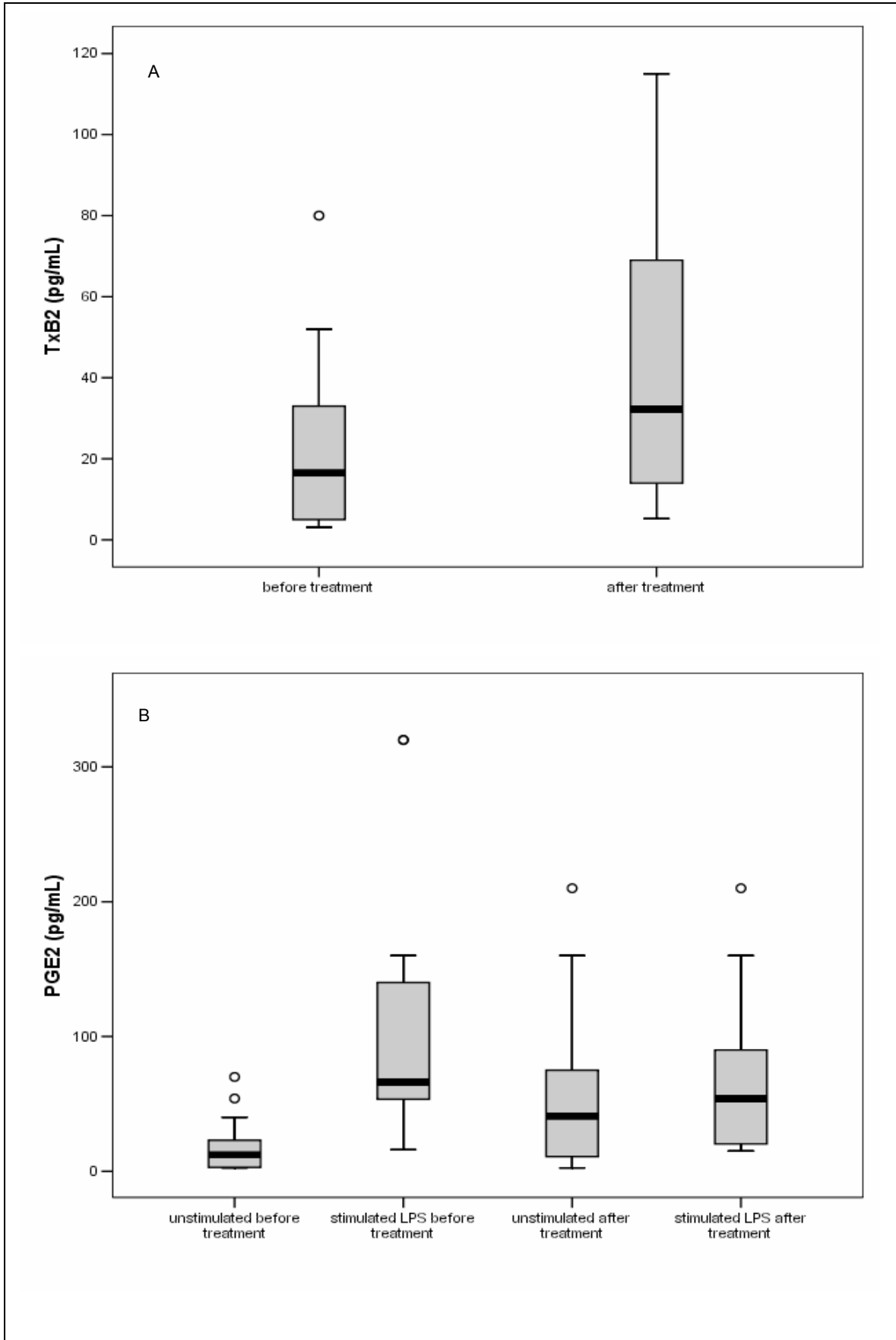


Figure 2: A and B

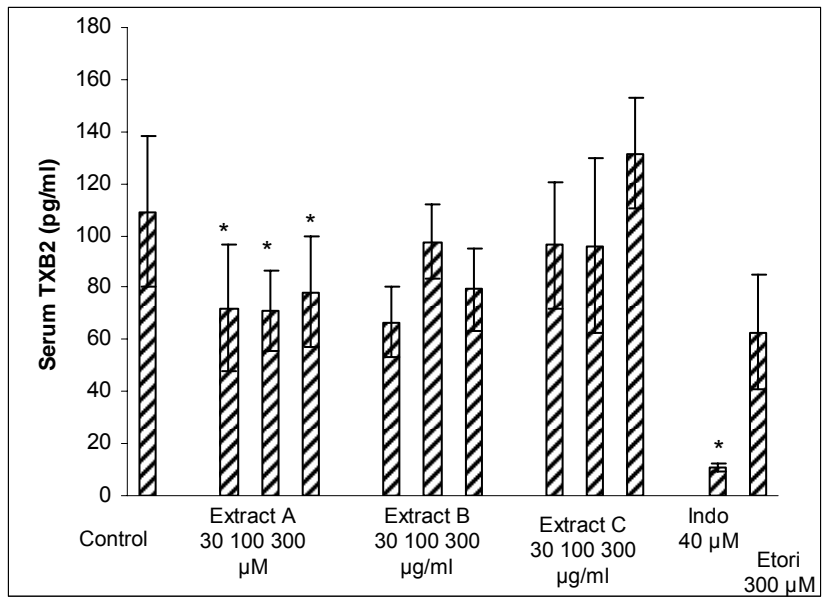


Figure 3.

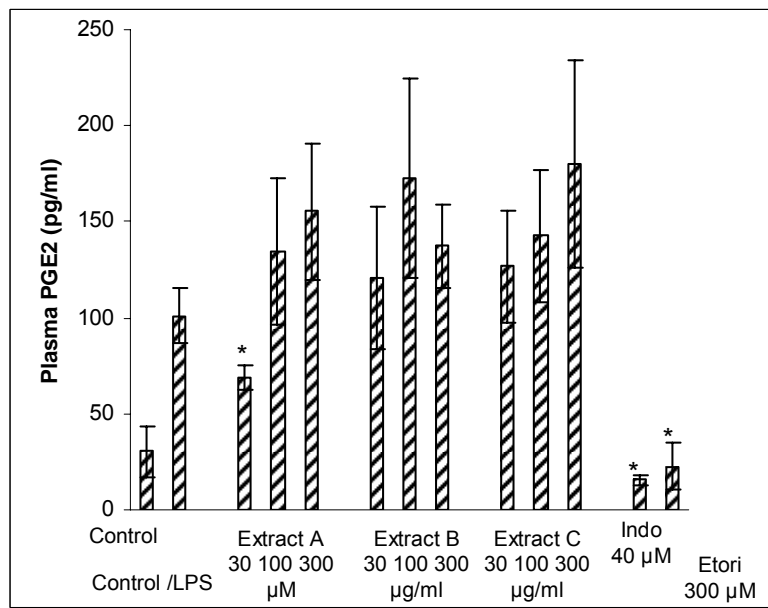


Figure 4.

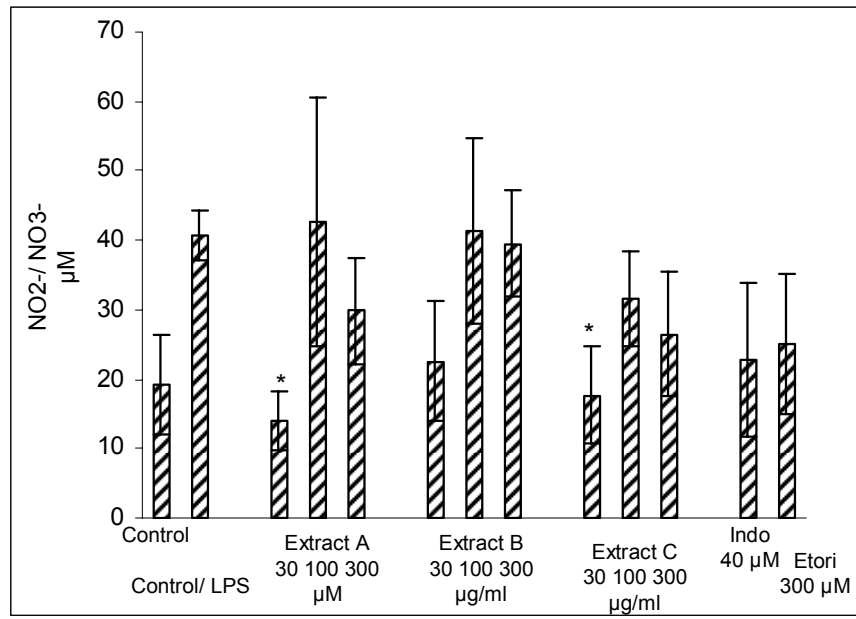


Figure 5.