

Amburana cearensis e Cumarina Imunomodulam os Níveis de anticorpos antígeno-específico em Camundongos BALB/c sensibilizados com Ovalbumina.

Maria das Graças Veloso MARINHO¹, Amabel Gomes de BRITO¹, Kellyanne dos Anjos CARVALHO¹,
Cláudio Roberto BEZERRA-SANTOS¹, Laise de Holanda Cavalcanti ANDRADE²,
José Maria BARBOSA-FILHO¹ & Marcia Regina PIUVEZAM^{1*}

¹ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Departamento de Fisiologia e Patologia,
Universidade Federal da Paraíba/UFPB. Campus I, Caixa Postal 5009,
CEP 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil.

² Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco/UFPE,
Cidade Universitária, CEP. 50372-970, Recife, Pe, Brazil.

RESUMO. No Nordeste do Brasil a casca de *Amburana cearensis* (Fr. All.) A.C. Smith (Fabaceae) é utilizada na medicina popular no tratamento de afecções do trato respiratório. O trabalho objetivou avaliar o efeito imunomodulador do extrato hidroalcoólico das cascas (EHA) da planta e da cumarina em modelo experimental de asma. A administração oral (400 mg/kg) ou intraperitoneal (200 mg/kg) de EHA e da cumarina, em camundongos BALB/c inibiu significativamente o edema de pata antígeno-induzido e a produção de imunoglobulina-OVA específica (50 a 80%). O EHA (200 ou 400 mg/kg, ip) também reduziu a permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos Swiss.

SUMMARY. "Amburana cearensis and coumarin immunomodulate the levels of antigen-specific antibodies in ovalbumin sensitized BALB/c mice". *Amburana cearensis* and coumarin immunomodulate the levels of antigen-specific antibodies in ovalbumin sensitized BALB/c mice. The trunk bark of *Amburana cearensis* (Fr. All.) A.C. Smith (Fabaceae) is used in Northeast Brazil in the folk medicine for treatment of respiratory diseases. The goal of this work was to evaluate the effect of the hydroalcoholic extract of the root bark (HAE) of the plant and the coumarin in the experimental model of asthma. Oral (400mg/ml) or intraperitoneal (200mg/ml) administration of HAE in BALB/c mice inhibited significantly the antigen-specific hind paw edema and production of immunoglobulin-OVA-specific (50 to 80%). The HAE also reduced the cutaneous vascular permeability induced by acetic acid in Swiss mice.

INTRODUÇÃO

Amburana cearensis (Fr. All.) A.C. Smith (Fabaceae) é uma planta da região Nordeste do Brasil, conhecida popularmente como cumaru, cumaru de cheiro, imburana, imburana de cheiro, amburana¹ e as cascas do caule vêm sendo amplamente utilizadas popularmente como antiinflamatória, emenagoga e especialmente no tratamento de inflamações do trato respiratório².

As análises químicas e farmacológicas desta planta têm demonstrado a presença de cumarina (1,2-benzopirona) como um dos componentes químicos mais abundante provavelmente sendo este o responsável, juntamente com outras substâncias (flavonóides e taninos), pela ação benéfica, das infusões das cascas, nas patologias do trato respiratório^{3,4}. Alguns trabal-

hos⁴⁻⁶ têm demonstrado que tanto as cascas quanto às sementes apresentam atividades antiinflamatórias e broncodilatadoras justificando, em parte, sua utilização, pela medicina popular, no tratamento da asma. Outros trabalhos têm mostrado que o extrato hidroalcoólico da casca apresenta efeito antinociceptivo, sedativo e antiedematogênico³.

Considerando que a asma é uma inflamação crônica das vias aéreas respiratórias e esta é mantida por células e substâncias oriundas da ativação das respostas imunes⁷, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador do extrato hidroalcoólico da casca do caule (EHA) de *Amburana cearensis* e da cumarina sobre a produção de imunoglobulina em camundongo BALB/c sensibilizados com ovalbumina.

PALAVRAS CHAVE: *Amburana cearensis*, Camundongos BALB/c, Imunoglobulina-OVA específica.
KEY WORDS: *Amburana cearensis*, BALB/c mice, Immunoglobulin-OVA-specific.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: mrpiuvezam@lft.ufpb.br

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do extrato hidroalcoólico (EHA) e obtenção da cumarina

As cascas de *Amburana cearensis* foram coletadas em São José do Bonfim e São José de Espinharas, Paraíba, Brasil, em agosto/2000. Os espécimes nº 3495 foram depositados no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, da Universidade Federal da Paraíba. As cascas frescas da planta (8,3 kg) foram secas em estufa a 55 °C por uma semana e pulverizadas, resultando 4,31 kg. Para obtenção do extrato, o material foi macerado com álcool a 70% em percolador, por 72 h. Após a coleta do primeiro extrato, o percolador foi reabastecido com álcool para nova extração, sendo o processo repetido por três vezes. O extrato hidroalcoólico (EHA) foi concentrado em rota-vapor, obtendo 108 g, com rendimento de 1,3%.

Na obtenção da cumarina, parte do EHA (50 g) foi solubilizada numa mistura metanol-água (40:60 v/v) e particionado em ampola de separação com hexano e em seguida clorofórmio. A fase clorofórmica depois de concentrada em rota-vapor forneceu 8 g de um óleo viscoso que foi realizada a cromatografia em coluna, empacotada com sílica gel, usando-se como eluente inicial hexano e em seguida misturas binárias de hexano e clorofórmio em gradiente crescente de polaridade até clorofórmio puro. As frações menos polares foram reunidas fornecendo 1,8 g de um material sólido, esbranquiçado, cujo ponto de fusão 67-69 °C indicou tratar-se de uma substância pura quando analisada através de cromatografia em camada delgada analítica. Essa substância foi submetida à análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono e foi identificada como a 1,2-benzopirona ou cumarina.

Nos ensaios farmacológicos a cumarina foi dissolvida em 300 ml de etanol e 2700 ml de salina.

Animais

Camundongos machos BALB/c (25-30 g) com 6-8 semanas, machos Swiss (25-35 g) com 8-10 semanas e ratos Wistar (206-250 g) machos, com 3-4 meses de idade foram usados nos experimentos. Os animais utilizados foram obtidos do biotério do Laboratório Tecnológico Farmacêutica (LTF/UFPB) e do Biotério do Laboratório de Imunologia (LTF/UFPB). Os pesos dos camundongos BALB/c foram monitorados durante todos os procedimentos experimentais.

Tratamentos de camundongos BALB/c com EHA, cumarina (Cum), dexametasona (DEXA), sensibilização e desafio com Ovalbumina (OVA)

Grupos de camundongos BALB/c (n = 6-9) foram tratados previamente por via oral (vo) com água (grupo controle-OVA) ou EHA (100 ou 400 mg/kg), durante quinze dias antes e durante as sensibilizações com OVA (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e por via intraperitoneal (ip) com EHA (100, 200 ou 400 mg/kg), dexametasona - DEXA (1mg/ml - Mase, USA) ou cumarina - Cum (10 ou 20 mg/kg) uma hora antes de cada sensibilização. Os grupos de animais não sensibilizados receberam água (vo) ou salina (ip). Para as sensibilizações os animais receberam nos dias 0 e 14 injeções de 0,5 ml (ip) de uma solução contendo 10 µg de OVA em 2,25 mg de Al(OH)₃ (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, BR) e no 21º dia os animais foram desafiados com aerossol (1% de OVA por 40 min.)⁸. No 2º dia após o desafio, foi realizado o teste cutâneo (TC). Um dia após o TC, foi realizada a sangria (plexo braquial) para obtenção dos soros e análise da produção de anticorpos anti-OVA específica pela técnica do PCA (anafilaxia cutânea passiva). Os soros foram estocados a -20 °C até o momento de uso.

Teste cutâneo (TC)

O teste cutâneo foi realizado injetando 20 µl da solução de OVA (20 mg/ml) na pata esquerda dos animais, enquanto que a pata direita recebeu 20 µl de solução salina⁹. A leitura do edema foi realizada nos tempos 30 min, 1 h e 2 h com paquímetro (Mitutoyo) e os resultados expressos em milímetros (mm).

Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)

A análise da produção de Imunoglobulina-OVA-específica foi realizada pela reação de anafilaxia cutânea passiva como descrito por Holt *et al.*¹⁰. Resumidamente, diluições dos soros (razão 2) dos camundongos foram inoculadas intradermicamente (id) em volume de 0,1 ml no dorso de ratos Wistar previamente tricotomizados. Após 24 horas, os ratos receberam, pela via intravenosa (iv) uma solução de OVA (2 mg/animal) em azul de Evans (1% - Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Uma hora após, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e o título do soro foi definido como a maior diluição do soro que apresentou mancha mensurável igual ou maior que 5 mm de diâmetro.

Permeabilidade Vascular

Grupos de camundongos foram tratados previamente, por via ip, com indometacina (20 mg/kg - Prodome, NJ, EUA - IND 20), EHA (100, 200 ou 400 mg/kg) ou salina e, uma hora após, os animais receberam o ácido acético (0,3 ml - 0,6% ip). Uma solução contendo azul de Evans (1% - iv) foi injetada 10-20 min antes da inoculação do ácido acético. Vinte minutos após a administração do ácido acético os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a realização do lavado peritoneal com 10 ml de água destilada¹¹. A solução foi centrifugada por 10min/1500 rpm/8 °C e analisada no espectrofotômetro (620 nm).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão para cada grupo de animais e avaliados pelo método estatístico do ANOVA (BONFFERONI) e Teste t-Student no GRAFPAD-PRISMA para determinar as diferenças significantes entre as médias. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

Efeito do EHA (vo) sobre o ganho de peso corporal de camundongos BALB/c sensibilizados com OVA.

Camundongos BALB/c tratados por via oral com EHA, nas doses de 100 ou 400 mg/kg, não apresentaram alterações significantes nos pesos antes e durante o processo de sensibilização com OVA, quando comparados com os animais que beberam água durante as sensibilizações (dados não mostrados). Os resultados demonstraram que os animais não rejeitaram o tratamento com o extrato da planta sugerindo que o tratamento com EHA não interferiu no desenvolvimento fisiológico dos animais.

Efeito do EHA e da cumarina sobre o edema de pata de camundongo BALB/c sensibilizado com OVA

Os resultados mostram que tratamentos com EHA (vo ou ip) ou cumarina (ip), antes das sensibilizações com OVA, induziram inibição significativa do edema de pata após desafio com o antígeno quando comparados com os animais não tratados e sensibilizados com OVA (Fig. A, B e C). A administração oral de EHA (400 mg/kg) inibiu significantemente o edema de pata na segunda hora enquanto que a dose de 100mg/ml não apresentou nenhum efeito sobre o edema (Figura 1A). Administração intraperitoneal do extrato na dose de 200mg/ml apresen-

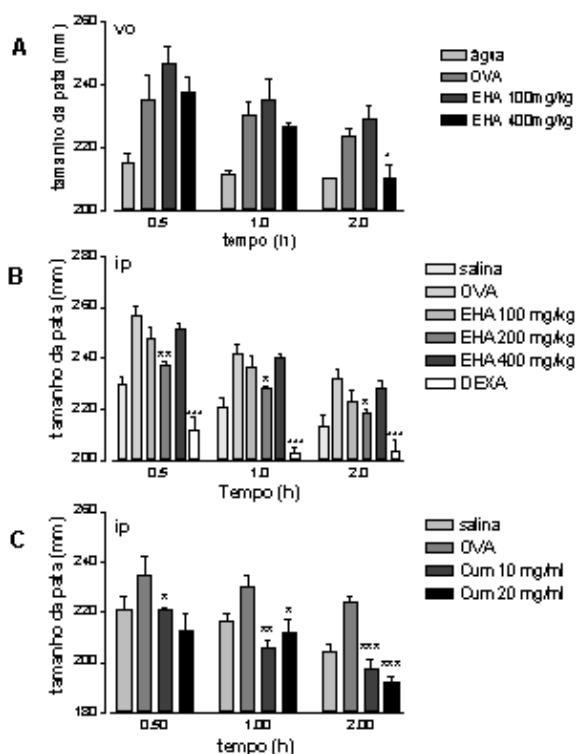


Figura 1. Efeito do EHA e cumarina sobre a formação de edema de pata em camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c (n = 6-9) foram tratados com: (A) EHA - 100 ou 400 mg/kg, vo; (B) EHA - 100, 200 ou 400 mg/kg, ip ou dexametasona (DEXA) e (C) cumarina (Cum) - 10 ou 20 μ g/ml, ip. Os grupos de animais - água, salina ou OVA - são os controles. Todos os animais, exceto os dos grupos água e salina, foram sensibilizados com OVA. Após o período de sensibilização, os animais foram inoculados com 400 μ g de OVA em 20 μ l de salina na pata esquerda. A pata direita foi inoculada com salina. O paquímetro foi usado para medir o aumento da pata. Os dados mostram a média \pm erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo de animais não tratados e sensibilizados com OVA.

tu efeito superior as doses de 100 e 400 mg/ml sobre o edema de pata (Figura 1B) sugerindo que o extrato pode conter componentes que, em concentrações maiores, devem estar agindo de forma antagônica. De forma semelhante, a cumarina (10 e 20 mg/ml) induziu a redução do edema de pata nos animais sensibilizados com OVA e desafiados com o antígeno (Fig. 1C). O perfil de inibição induzido pela planta e pela cumarina foi semelhante ao da dexametasona (Fig. 1B).

Efeito do EHA e da cumarina sobre a produção de imunoglobulina-OVA específica em camundongos BALB/c

Tratamentos com EHA (ip ou vo) ou cumarina em animais sensibilizados com OVA apresen-

taram diminuição significativa ($p < 0,01$) nos títulos séricos de imunoglobulina anti-OVA específica quando comparados com os animais não tratados. A diminuição da produção de anticorpos anti-OVA variou de 50 a 81% entre os animais tratados (Fig. 2). Ambas as vias de administração do EHA utilizadas nos tratamentos dos animais sensibilizados com OVA foram eficientes em bloquear a produção de imunoglobulina anti-OVA por linfócitos B. As doses de cumarina (10 e 20 mg/ml) induziram inibição nos títulos de anticorpos anti-OVA de forma semelhante aos tratamentos com EHA ou dexametasona (Fig. 2). Estes resultados demonstraram que os tratamentos com EHA ou cumarina inibiram significativamente a produção de imunoglobulina-OVA específica em modelo experimental de asma.

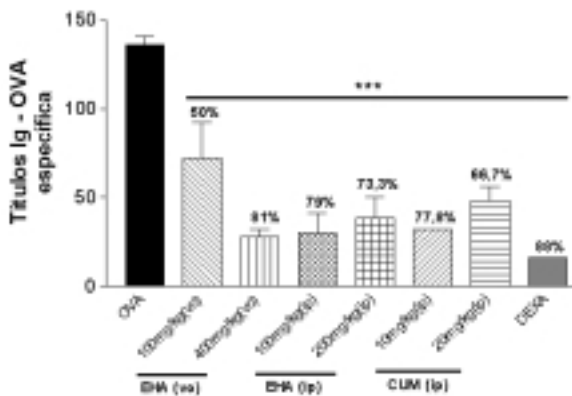


Figura 2. Efeito do EHA e da cumarina sobre a produção de imunoglobulina-OVA específica em camundongos BALB/c sensibilizados com OVA. Camundongos BALB/c ($n = 6-9$) foram tratados com: salina (OVA), EHA (100 ou 400 mg/kg, vo / 100 ou 200 mg/kg, ip), cumarina (Cum - 10 ou 20 mg/kg, ip) e dexametasona (DEXA - 1 mg/ml, ip) antes e durante as sensibilizações com OVA. Os títulos de imunoglobulina OVA-específica, nos soros, foram determinados pela técnica de PCA. As análises estatísticas foram realizadas pelo método ANOVA (BONFERRONI). Os valores de $p < 0,001$ (***) foram considerados significativos quando a comparação foi feita entre os animais tratados com o grupo controle. Dados representativos de dois experimentos.

Efeito do EHA sobre a permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético em camundongos Swiss

Grupos de camundongos Swiss tratados com o EHA (200 ou 400 mg/kg, ip) apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) na permeabilidade vascular peritoneal induzida pelo ácido acético quando comparados com o do grupo controle (salina). A dose de 100 mg/kg do EHA não apresentou efeito significativo na permeabilidade

vascular peritoneal quando comparada com o do grupo controle (Fig.3).

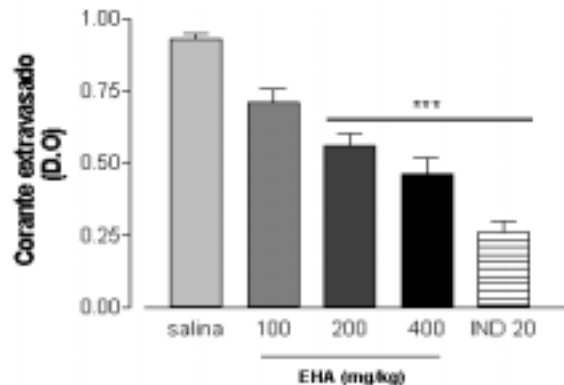


Figura 3. Efeito do EHA sobre o aumento da permeabilidade vascular. Camundongos Swiss ($n = 6-8$) foram tratados com: salina, EHA (100, 200 ou 400 mg/kg - ip) ou indometacina (IND 20) 1 h antes da injeção com ácido acético 0,6% (ip). As cavidades peritoneais foram lavadas com água destilada e as soluções quantificadas por espectrofotometria (620 nm). O corante azul de Evans (1%) foi administrado (iv) 20 min. antes da injeção do ácido acético em todos os grupos. Os dados mostram a média \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste t-Student. Valores com *** $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Neste trabalho nós investigamos o efeito do extrato hidroalcoólico das cascas de *Amburana cearensis* (EHA) e seu componente majoritário, a cumarina, na produção de imunoglobulina anti-ovalbumina em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a administração oral não interferiu no ganho de peso dos camundongos quando comparados com os animais que beberam água. Com relação às avaliações toxicológicas (agudas e sub-crônicas) da planta foi demonstrado que o extrato da *Amburana cearensis* quando administrado oralmente apresentou baixa toxicidade em ratos ³. Nos ensaios de dose letal de 50% (DL50) para o EHA, observou-se que doses até 5000 g/kg não causaram morte nos animais. Portanto, as doses de EHA utilizadas neste trabalho são doses que não interferiram na sobrevivência dos animais. Os camundongos tratados com EHA (ip ou vo) ou cumarina, antes e durante as sensibilizações com OVA, apresentaram diminuição na produção de imunoglobulina anti-OVA e redução do edema de pata. A permeabilidade induzida por ácido acético em camundongos Swiss foi também inibida pelo extrato. Os dados apresentados neste trabalho sugerem que a *Amburana*

cearensis imunomodula a produção de imunoglobulina no modelo experimental de asma.

A *Amburana cearensis* é uma planta que vem sendo utilizada na medicina popular para o tratamento das afecções das vias respiratórias, como asma e bronquite ², e vários trabalhos científicos, utilizando diferentes partes da planta (casca e semente), vêm sendo realizados para respaldar, cientificamente, sua utilização pela medicina popular no tratamento das afecções do trato respiratório ^{4,6,12, 13}.

As administrações, por via oral ou intraperitoneal, de EHA e cumarina, em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina, promoveram redução do edema de pata induzido pelo antígeno. Entretanto, o tratamento intraperitoneal foi mais eficiente em promover diminuição do edema de pata quando comparado com administração oral. Os efeitos sobre a formação de edema e a atividade nociceptiva de extratos de *Amburana cearensis* e da cumarina têm sido descritos utilizando modelos experimentais com carragenina como agente flogístico e formalina. Nestes estudos foram demonstrados que, tanto o extrato como a cumarina foram capazes de diminuir a dor e o edema desencadeados pela formalina e pela carragenina ³. Os resultados demonstrados no nosso trabalho corroboram com aqueles anteriormente publicados, embora os mecanismos de ação da planta sobre o edema de pata antígeno-induzido no modelo experimental de asma devem estar ligados à produção de imunoglobulina. Em adição, o aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético foi inibido pelo extrato sugerindo um efeito sobre os mediadores produzidos durante a inflamação aguda ^{4,11}.

O EHA ou cumarina quando administrados oral ou intraperitonealmente, em camundongos BALB/c sensibilizados com OVA, induziram uma redução significativa na produção de imunoglobulina anti-OVA. O efeito da planta sobre a produção de imunoglobulina no modelo animal utilizado corrobora com a sua utilização na medicina popular para o tratamento da asma. Em adição a estes resultados, Leal e colaboradores ⁴ demonstraram que o extrato, a cumarina e uma fração do extrato contendo flavonóides da *Amburana cearensis* apresentaram efeitos broncodilatador, sobre músculos de traquéia de cobaias sensibilizados com OVA e pré-contraídos com carbacol.

A asma vem sendo considerada uma inflamação crônica das vias aéreas respiratórias e esta inflamação é mantida pelos produtos da resposta imune tais com imunoglobulinas e citoci-

nas ⁷. As IgE são produzidas por linfócitos B alérgeno-específicos. Estas imunoglobulinas são, em parte, as responsáveis pela patogênese da asma, pois se ligam aos receptores de mastócitos presentes nas vias aéreas e quando na presença do alérgeno, o qual se liga a no mínimo duas molécula de IgE, provoca degranulação celular com liberação de vários mediadores químicos que atuam sobre o epitélio brônquico agravando o quadro clínico da asma ¹⁴. A produção da IgE nesta patologia está diretamente associada a um perfil de citocinas secretadas por células T do tipo Th2 (interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13) presentes nos pulmões ¹⁵.

Os estudos de plantas medicinais com atividades antialérgicas vêm sendo realizados por diferentes grupos de pesquisadores e são vários os trabalhos que demonstram os efeitos de plantas sobre fenômenos alérgicos. Hong-Xi Xu *et al.* ¹⁶ demonstraram em modelo de camundongos BALB/c sensibilizados com DNP-OVA, que estes animais quando tratados com o extrato aquoso de *Miscanthus sinensis* apresentavam diminuição de IgE antígeno-específica nos soros. O tratamento oral com o extrato aquoso de *Siegesbeckia glabrescens* também inibiu, in vivo, a produção de IgE em camundongos ICR sensibilizados com OVA, *Bordetella pertussis* e Al(OH)₃, assim como a produção, in vitro, de IgE dependente de IL-4 ¹⁷.

Drogas, sinteticamente produzidas, são utilizadas para impedir a produção de IgE, a síntese de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de células para o sítio da inflamação, incluindo células T, eosinófilos e basófilos ¹⁸⁻²⁰. Glicocorticóides são bastante utilizados como tratamento de escolha para indivíduos que desencadeiam crises alérgicas após exposição ao alérgeno. Dexametasona é bastante utilizada devido ao seu potente efeito antialérgico e sua atividade antiasmática ²¹. Um mecanismo de ação proposto para esta droga é a supressão das enzimas fosfolipase C e A2 por lipocortinas em diferentes tipos de células ²². Puignero *et al.* ²³ demonstraram que o tratamento oral com dexametasona em camundongos BALB/c, sensibilizados com OVA e hidróxido de alumínio, inibiu a produção de IgE e, quando administrado por via subcutânea, inibiu o influxo de células para o sítio da inflamação. Devido à importância de se descobrir novos fármacos, a baixo custo e com baixa toxicidade, para o tratamento das afecções do trato respiratório, acreditamos que a planta em estudo vem somar como um possível fitoterápico às drogas que vem sendo utilizadas para o tratamento da asma brônquica.

REFERÊNCIAS

1. Correa, M.P. (1984) *"Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas"*, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, Brazil, vol. 5, pág.320.
2. Agra, M.F. & J.M. Barbosa Filho (1990) *Rev. Bras. Farm.* **71**: 72-5.
3. Leal, L.K.M., M.E. Matos, F.J.A. Matos, R.A. Ribeiro, F.V. Ferreira & G.S.B. Viana (1997) *Phytotherapy* **4**: 221-7.
4. Leal, L.K.M., M. Nechio, E.R. Silveira, K.M. Canuto, J.B. Fontenele, R.A. Ribeiro & G.S.B. Viana (2003) *Phytother. Res.* **17**: 335-40.
5. Leite, M.G.R., C.L. Souza, M.A.M. Silva, L.K.A. Moreira, F.J.A. Matos & G.S.B. Viana (1992) *Rev. Bras. Farm.* **74**: 12-15.
6. Matos, F.J.A. (1999) *"Plantas da Medicina Popular do Nordeste: Propriedades Atribuídas e Confirmadas"*, Fortaleza: Eufc. 80 p.
7. Larché, M., D.S. Robinson & A.B.K. Kay (2003) *J. Allergy Clin. Immunol.* **11** (3): 450-463.
8. Oshiba, A., E. Hamelmann, K. Takeda, K.L. Bradley, J.E. Loader, G.L. Larsen & E.W. Geleand (1996) *J. Clin. Invest.* **97**: 1398-408.
9. Facincone, S., A.L.P. Siqueira, S.J.M. Russo, J.A.M. Barbuto & M.A. Mariano (1997) *Mediat. Inflamm.* **6**: 127-33.
10. Holt, P.G., A.H. Rose, J.E. Batty & K.J. Turner (1981) *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* **65**: 42-50.
11. Dai, Y., Y.P. Chan, L.M. Chu & P.P.H. Butn (2002) *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 1179-82.
12. Diniz, M.F.F.M., R.A. G. Oliveira, A.C.D. Meireiros (1998) *"Mementos fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica: aspectos populares e científicos"*, Editora Universitária/UFPB, João Pessoa.
13. Matos, F.J.A. (1998) *"Farmácias Vivas: Sistemas de Utilização de Plantas Medicinais Projetado para Pequenas Comunidades"*, 3ª Ed. rev. atual., Fortaleza: Eufc. 220 p.
14. Li, X.-M., B.H. Schofield, Q.F. Wang, K.H. Kim & S.K. Huang (1998) *J. Immunol.* **160**: 1378-84.
15. Henderson, W.R., E.Y. Chi & C.R. Maliszewski (2000) *J. Immunol.* **164**: 1086-1095.
16. Hong-Xi X., S. Kodota, M. Hattori, T. Takahashi, Y. Kojima & T. Namba (1993) *Planta Med.* **59**: 529-32.
17. Kim, H.M. (2001) *Phytother. Res.* **15**: 572-6.
18. Namba, T., H. Xu, S. Kadota, & M. Hattori (1993) *Phytother. Res.* **7**: 227-30.
19. Perretti, M. & R.J. Flower (1993) *J. Immunol.* **150** (3): 992-9.
20. Kimata, M., T. Abe, I. Yamaguchi, K. Mito, M. Tsunematsu, N. Inagachi & H. Nagai (2001) *Pharmacology.* **62**: 17-22.
21. Das, A.M., R.J. Flower, P.G. Hellewell, M.M. Teixeira & M.A. Perretti (1997) *Brit. J. Pharmacol.* **121**: 97-104.
22. Hirata, F. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**: 7730-3.
23. Puigneró, V., J. Salgado & J. Queralt (1995) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **108**: 142-7.