

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA ROMÃ (*PUNICA GRANATUM*) NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO

THE ANTI-INFLAMATORY EFFECT OF THE POMEGRANATE (*PUNICA GRANATUM*) IN THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Antônio Luiz Martins Maia Filho

Doutor em Engenharia Biomédica pela Universidade do Vale do Paraíba –UNIVAP
Docente da Universidade Estadual do Piauí –UESPI
Email: almmaiaf@gmail.com

Wcleubianne Matias Nascimento

Graduada em Farmácia pela FACID/DeVry
Email: bianne_bb@hotmail.com

Esmeralda Maria Lustosa Barros

Graduada em enfermagem pela Associação de Ensino Superior do Piauí – AESPI
Email : esmeraldalustosa@gmail.com

Débora Alencar Franco Costa

Doutora em Engenharia pela Unicastelo-SP
Docente da FACID/DeVry
Email: debora.genetox@gmail.com

Milane Karynelly Coelho Almeida

Graduanda em Medicina Faculdade Integral Diferencial
Email: milanekary@hotmail.com

Endereço: Antônio Luiz Martins Maia Filho
Universidade Estadual do Piauí, Rua João Cabral, 2231 - Pirajá, Teresina - PI, 64002-150.

Editora-chefe: Dra. Regina da Silva Santos

Artigo recebido em 04/03/2015. Última versão recebida em 07/05/2015. Aprovado em 08/05/2015.

Avaliado pelo sistema Triple Review: a) Desk Review pelo Editor-Chefe; e b) Double Blind Review (avaliação cega por dois avaliadores da área).



RESUMO

Introdução: A lesão pulmonar aguda (LPA) e sua forma mais grave, a síndrome da angústia respiratória aguda (SDRA), são o denominador comum de várias doenças que podem provocar nflamação exagerada nos pulmões. **Objetivos:** Analisar a ação antiinflamatória da Romã (*Punica granatum*) em modelo experimental de inflamação pulmonar aguda induzida em ratos. **Métodos:** Foram utilizados 15 ratos fêmeas, espécie *Rattus norvegicus*, divididos em três grupos: Falso-operado (incisão abdominal), Sham (isquemia e reperfusão intestinal - I/R-i); tratado (I/R-i + infusão da romã). **Resultados:** O grupo tratado apresentou redução de células inflamatórias, quando comparado com o grupo sham ($p < 0.001$). Por outro lado, os resultados sugerem que o grupo tratado não apresentou significância estatística em relação ao grupo falso-operado. **Conclusão:** Sugere-se que a nebulização da Roma reduz a resposta inflamatória pulmonar advinda da lesão por I/R-i.

Palavras-chave: Isquemia. Reperfusão. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). *Punica granatum*.

ABSTRACT

Introduction: Acute lung Lesion (ALL) and more severe form, the acute respiratory distress syndrome (ARDS), are the common denominator of many diseases that can cause an exaggerated lung inflammation. **Objective:** The aim of the study was to analyze the anti-inflammatory action of Pomegranate (*Punica granatum*) in an experimental model of acute lung inflammation induced in mice. **Methods:** A total of 15 female rats, species *Rattus norvegicus*, divided into three groups: Fake-operated, sham (ischemia + reperfusion I/R-i); treated (I/R-i + infusion of Pomegranate). **Results:** The treated group showed a reduction of inflammatory cells, when compared with the sham group ($p < 0.001$). Moreover, the results suggest the treated group showed no statistical significance in relation to false-operated group. **Conclusion:** It is suggested that the infusion of Pomegranate reducing the pulmonary inflammatory response to injury arising from the I/R-i.

Keywords: Ischemia. Reperfusion. Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *Punica granatum*.

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é designada como insuficiência respiratória decorrente da resposta inflamatória que cursa com alterações da permeabilidade alvéolo-capilar, edema pulmonar e hipoxemia refratária aos altos fluxos de oxigênio (GEISER, 2003).

Admite-se que, na SDRA, ocorra lesão do epitélio alveolar e do endotélio capilar, por diferentes mediadores pró-inflamatórios, particularmente pelas citocinas, tais como: TNF- α (fator de necrose tumoral), IL-1 β (interleucina 1) e IL-8 (interleucina 8), liberadas em resposta a grande variedade de precipitantes seja de lesão pulmonar direta ou indireta (MELO, 2010).

Na SDRA pulmonar, a agressão primária se dá no epitélio, com consequente inflamação alveolar; como no caso de pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico e trauma torácico, já na SDRA extrapulmonar a injúria inicia-se pelo endotélio, por mediadores inflamatórios presentes na corrente sanguínea, como na sepse, pancreatite e múltiplos traumas (PINHEIRO; LISBOA; HOLANDA., 2011).

Ainda buscam a melhor forma de reabilitar as funções pulmonares de pacientes com lesão pulmonar aguda, e síndrome do desconforto respiratório agudo, dentre esses estudos encontram-se os que abordam os fitoterápicos, que consistem na utilização terapêutica de plantas medicinais para desencadear a modulação de processos fisiológicos (OLIVEIRA, 2009).

Ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas e muitos possuem atividade anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2009).

A romanzeira é popularmente usada para o tratamento de um grande número de doenças inflamatórias e infecciosas, incluindo lesões e abscessos de pele e mucosas, amigdalites, faringites, estomatites, gengivite, glossite, afecções febris, diarreias de origem bacteriana e parasitária, cólicas, hemorroidas, infecções de vias urinárias e

genitais, viroses em geral, infecções por fungos, conjuntivites e doenças respiratórias, como bronquites (HOLETZ et al., 2002).

Devido à natureza inflamatória da síndrome do desconforto respiratório agudo, e considerando os efeitos biológicos das plantas e frutos, o presente trabalho propõe um estudo do efeito antiinflamatório da Romã sobre a inflamação pulmonar aguda em modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal em ratos. Diante do tema abordado, elaborou-se o seguinte problema de pesquisa: A *Punica granatum* (Romã) impede a instalação da síndrome da angústia respiratória?

O estudo justifica-se pela observação das consequências da SDRA, a qual ocasiona profundas alterações a nível de trocas gasosas, mecânica do sistema respiratório e circulação pulmonar, sendo a principal componente para falência múltipla de órgãos e tecidos.

Neste contexto, faz-se necessário a vigente pesquisa científica com intuito de relevância científica e social mediante uso terapêutico da Romã, e ação antiinflamatória da casca do fruto para tratamento da síndrome respiratória, e por segunda intenção em condições experimentais com potencial para aplicação clínica em seres humanos.

O presente estudo teve como objetivo geral verificar a ação antiinflamatória da *Punica ganatum* (Romã) em modelo experimental de inflamação pulmonar aguda induzida em ratos. E como objetivo específico causar, através de isquemia e reperfusão intestinal, lesão pulmonar aguda, e também, avaliar o efeito da Romã por meio de histopatológica do pulmão e lavado brônquico alveolar.

2 METODOLOGIA

O protocolo de pesquisa foi submetido a análise e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/FACID, sob o protocolo 014/13. Seguindo os princípios éticos da experimentação animal de acordo com os critérios propostos pela Lei Arouca nº 11.794 - 2008: Experimentação Animal.

A pesquisa realizada corresponde a um estudo experimental em ratos, com abordagem quantitativa sobre o efeito anti-inflamatório da *Punica granatum* (Romã) sobre a inflamação pulmonar aguda em modelo de isquemia e reperfusão intestinal.

Os frutos da romãzeira dos quais foram extraídos a casca utilizado no presente estudo foram coletados no município de Ribeira, Piauí, no período de Abril de 2014.

A casca da Romã foi retirada manualmente, em seguida foram submetidas a processo de desidratação e trituração. Foram colocados 500 ml de água em kitassato, sobre a chapa quente e após entrar em ebulição foi desligada e adicionado 50 g de casca de Romã (processo de infusão), posteriormente foi feita a nebulização com o auxílio de um aparelho inalador/nebulizador.

Os animais utilizados foram ratos da espécie *Rattus norvegicus* variedade Wistar (pesando de 200-250g), fêmeas, provenientes do Biotério de instituição de ensino superior privado, mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e ciclo claro-escuro de 12h, iniciando às 6h. Os animais foram mantidos em suas gaiolas moradias (5/gaiola) com livre acesso à água e alimentação.

Foi utilizado total de 15 animais divididos aleatoriamente em três grupos experimentais de 5 animais cada, sendo os seguintes: Sham (isquemia e reperfusão intestinal I/R-i); Falso-operado; Tratado (I/R-i + nebulização com infusão da Romã).

Os animais foram previamente tratados com solução de atropina a 2% (0,2 mL para cada 100g de peso de animal) e 15 minutos após, eram anestesiados recebendo 0,1 ml para cada 100g de peso animal da solução composta de quetamina 5% e xilazina 2% na proporção de 1:1, administrado por via intramuscular. (Figura 1).

Figura 1 – Aplicação intramuscular do anestésico. Teresina, 2014



Fonte: ALMEIDA (2014)

Decorrido a aplicação dos anestésicos, citados anteriormente, e após laparotomia mediana e desvicerização a isquemia intestinal, foi induzida pelo pinçamento da artéria mesentérica superior por 45 min (Figura 2).

Figura 2 – Localização da artéria mesentérica superior, seguida da indução do processo isquêmico através do pinçamento. Teresina, 2014



Induzindo a isquemia na artéria mesentérica superior

Fonte: ALMEIDA (2014)

O pinçamento foi realizado com pinça vascular de microcirurgia. Durante o período de 45 minutos da isquemia, a incisão abdominal foi coberta com um plástico transparente para minimizar perdas de líquido e calor (Figura 03). Decorrido o tempo desejado de isquemia, a pinça vascular foi retirada, e iniciada o período de reperfusão intestinal.

Figura 3 – Demonstração dos animais do grupo sham (controle) durante o período de isquemia intestinal



Fonte: Almeida (2014)

A terapêutica realizada (Figura 04) equivale a nebulização com infusão da Romã – Após o tempo de isquemia já descrito, este grupo foi submetido à inalação de 50g(10g/animal) durante 2 minutos.

Figura 4 – Terapêutica realizada com nebulização da infusão da *Punica granatum*. Teresina, 2014



Promovendo a nebulização com a Romã

Fonte: ALMEIDA(2014)

Após 45 minutos de reperfusão intestinal, os animais foram novamente anestesiados e sacrificados por dose excessiva de anestésico pela aorta abdominal após 90 minutos (Controle - isquemia e reperfusão 90', Tratado - isquemia e reperfusão + infusão da Romã 90'). Posteriormente, os pulmões foram retirados para a análise histológica.

O grupo constituído de animais falsamente manipulados (falso-operado), em que a incisão abdominal foi realizada, porém a isquemia não foi induzida, também foram sacrificados com 90 minutos e incorporados aos estudos.

A análise histológica pulmonar foi realizada no modelo de inflamação sistêmica. Para tanto, os pulmões foram removidos e o lobo pulmonar inferior esquerdo foi separado e submetido ao processo de fixação, permanecendo em formol a 10% por 48 horas.

Após a fixação, o tecido pulmonar foi submetido ao processo de desidratação, permanecendo 24 horas em álcool 70% e mais 24 horas em álcool 96%. Posteriormente, o tecido pulmonar foi imerso em álcool absoluto (100%) durante o período de 8 horas. Em seguida, o tecido pulmonar foi diafanizado em xilol e emblocado em parafina.

Por fim, o material foi processado em micrótomo, com cortes histológicos de 3µm de espessura, seguidos dos procedimentos de coloração pela técnica da hematoxilina-eosina (HE), posteriormente as amostras de tecido pulmonar foram analisadas microscopicamente no que diz respeito às células inflamatórias.

Para a morfometria, utilizou-se um microscópio invertido trinocular, de marca Labomed iVu3100, modelo TCM 400, acoplado a uma câmera fotográfica NA030, utilizando o software PixelPro™, com aquisição de fotos no aumento de 400X. Para cada animal, foram obtidas quatro imagens em campos diferentes para realização da contagem do número de células inflamatórias totais do campo de observação, utilizando o programa de computador Image J na sua função "cell conter".

Após a coleta de dados, foram organizados em planilha no programa Microsoft Office Excel 2007. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o GraphPad Prism 5.0. e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste Tukey para comparação das médias. Os resultados serão expressos como a média ± erro padrão da média (EPM) e desvio padrão (DP). Valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos.

3 RESULTADOS

Os resultados (Tabela 01) indicam que o tecido pulmonar dos animais submetidos ao tratamento com nebulização da infusão da Romã, com valores médios de 415,2(±26,40), juntamente com grupo falso-operado, com valores médios de 389,2 (±19,89) apresentaram significância estatística de $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente, em relação ao grupo controle (sham), com valores médio 602,8 (±43,26), sugerindo a diminuição de células inflamatórias, causados pela I/R-i.

Tabela 1- Análise da Média e desvio padrão (DP) das células inflamatórias dos grupos Tratado e Falso operado em relação ao grupo Controle através da microscopia óptica. Teresina, 2014

Grupos	Média (DP)
Falso operado	352,5(118,7)
Controle (I+R)	653,5(31,55)
Tratado (I+R+Romã)	440,5 (62,88)

Fonte: ALMEIDA (2014)

Nos pulmões, os mediadores inflamatórios podem lesar, diretamente ou através da quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN), a membrana alvéolo-capilar, determinando o surgimento de edema pulmonar, o qual pode estar presente em situações de isquemia e reperfusão á distancia, como no pós-operatório de cirurgias com pinçamento temporário da aorta e nas condições de choque circulatório (ROCHA ET AL, 2007), corroborando com a metodologia aplicada no estudo em questão, e os vigentes resultados dos grupos experimentais que foram induzidos ao processo de I;R-i ocasionando um aglomerado de infiltrados inflamatórios.

Conforme Marqui *et. al.* (2011) a microvasculatura pulmonar, em especial, parece ser bastante susceptível às lesões resultantes da ativação de mediadores inflamatórios sistêmicos decorrente de estresse oxidativo em órgãos à distância, corroborando com procedimentos realizados no grupo sham e tratado, onde o pinçamento da artéria mesentérica superior, seguida do restabelecimento do fluxo sanguíneo foram capazes de desencadear lesão pulmonar aguda.

Os resultados presentes no grupo sham são reforçados no estudo de Melo (2010), em modelo de inflamação pulmonar induzida em ratos, realizou-se o processo de I/R-i pelo pinçamento da artéria mesentérica superior após 45 minutos, verificou-se o recrutamento de células inflamatória, notadamente neutrófilos.

Os resultados obtidos demonstram que a nebulização da *Punica granatum* apresenta efeito antiinflamatório, quando ministrado 50g (10g/rato) da casca da Romã em processo de infusão inalatória no período de 2 minutos, a partir de 45 minutos após a indução da inflamação pulmonar, sugerindo uma modulação da resposta inflamatória pulmonar. Em algumas das etapas da migração celular. Podemos sugerir que, com a redução de células inflamatórias para o tecido inflamado, a liberação de citocinas e de outros também estará reduzida, potencializando desta forma o benefício da nebulização da infusão em questão.

Foram estudados extratos da romã (etéreos, alcoólico e aquosos) e todos eles mostraram a capacidade de prolongar a indução da oxidação. Os que mais apresentaram inibição da oxidação foram os extratos aquosos (JARDINI, 2007). Esses estudos sugerem que os antioxidantes naturais presentes na Romã, tiveram ação sobre os mediadores inflamatórios, atacando radicais livres.

Já foi observado que a romã é rica em punicalagina, um tanino elágico derivado do fruto da romanzeira, e é provavelmente um dos principais constituintes antimicrobianos desta fruta (MACHADO et al., 2003).

A *Punica granatum* é popularmente conhecida no Brasil como Romã e seus frutos são usados no tratamento de infecções de garganta, rouquidão e febre. Pode também ser utilizada como anti-séptico e antiviral em processos inflamatórios da mucosa oral e contra herpes genital (MENEZES, 2008). Tais estudos reforçam a ação anti-inflamatória da Romã, minimizando os danos celulares no pulmão de ratos.

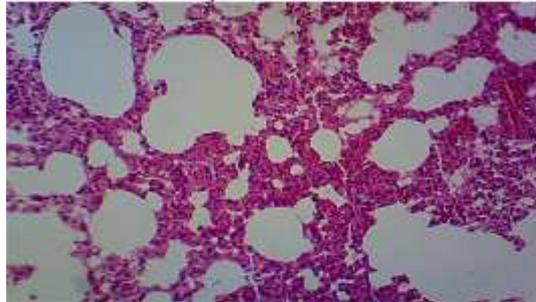
A respeito do mecanismo de ação da Romã sobre a redução do número de células inflamatórias podemos sugerir que houve proteção celular contra danos oxidativos induzidos por I/R-i, sendo mediada por componentes antioxidantes presentes na Romã. Fato este que se justifica com a intensidade da inflamação presente no exame histológico do pulmão dos animais do grupo tratado (I/R-i + com nebulização da infusão da Romã) apresentem significativa redução do número de células inflamatórias, ao comparar-se com o número de células inflamatórias presentes no grupo controle, significativamente maiores e isento de tratamento.

Na avaliação histológica realizada no estudo de Rocha et al (2007), a correlação entre o grau de comprometimento pulmonar – através da contagem de neutrófilos por campo e o estado metabólico no rato induzido a sepse por peritonite fecal – confirma a existência de resposta inflamatória sistêmica, visto que no pulmão saudável há neutrófilos nos septos pulmonares, corroborando com os resultados das

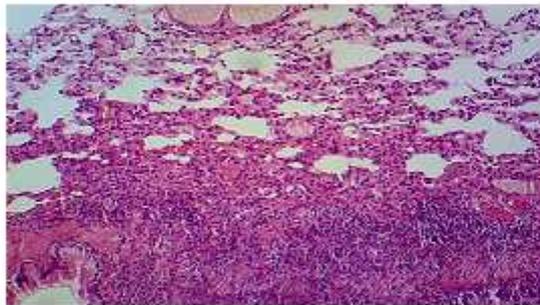
experiências que, após o processo de I;R-i, houve aumento de células inflamatórias em tecido pulmonar de ratos do grupo controle em comparação com grupo tratado que mediante terapêutica aplicada, apresenta menor quantidade de infiltrado inflamatório, sugerindo a ação antiinflamatória da Romã.

A Romã já é bastante usada no tratamento de dispepsia, disenteria, inflamações de gengiva, possuem atividade adstringente e hemostática, bastante usada também no tratamento da diabetes mellitus e possui uma alta eficácia quando usado contra úlceras na boca e genitália. Satisfatoriamente usado nas bronquites. (LANGLEY, 2000).

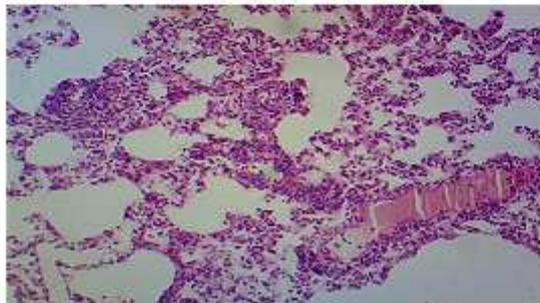
Figura 6 – Microscopia do lobo pulmonar inferior esquerdo. (A) Falso – operado. (B) Controle. (C) Tratado com nebulização da infusão da Romã. Teresina, 2014



A



B



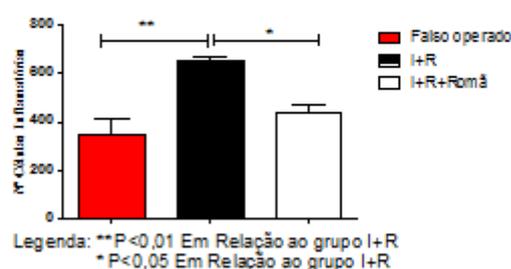
C

Nossos resultados estão alinhados com Werkman (2008), demonstrando que na Romã possui atividades antimicrobianas e principalmente antiinflamatórias.

Contudo, cabe ressaltar que nossos resultados sugerem que o grupo tratado não apresentou significância estatística quanto ao número de células inflamatórias quando comparado com a observada no grupo falsamente manipulado (Gráfico 1).

Sugere-se que ato incisional na região abdominal e a geração de radicais livres desencadearam um potencial comprometimento parenquimatoso pulmonar no grupo falsamente manipulado. Uma explicação para estes resultados, reside na possibilidade do esgotamento precoce das reservas antioxidantes pulmonares, em face do estímulo inicial, mas capaz de conter dano mais acentuado. (FERRO *et al.*, 2010).

Gráfico 1 - Numero de células inflamatórias das células inflamatórias dos grupos Tratado e Falso operado em relação ao grupo Controle. Teresina, 2014



Fonte: ALMEIDA (2014)

Quando a geração de radicais livres é maior que a sua degradação pelas defesas antioxidantes, produz-se um desequilíbrio no organismo, denominado de estresse oxidativo, o que pode levar danos, dependendo da sua extensão, da duração e do tipo de oxidante implicado. (SIES; SHAL; SEVANIAN, 2005).

No presente estudo, pode-se sugerir que mediante indução do processo isquêmico e reperfusional do grupo controle ocorre uma maior área de preenchimento com infiltrados inflamatórios, e no grupo falso-operado como não sofreu essa mesma lesão, justifica-se a menor quantidade de células inflamatória sugerindo que, de acordo com o agente causal, tem-se um dano parenquimatoso adequado a lesão ocasionada.

Tendo em vista a complexidade do processo inflamatório pulmonar, pode-se sugerir que a nebulização da *Punica granatum*, proporciona uma redução da injúria pulmonar, promovendo com eficiência o controle da inflamação.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente estudo, pode-se concluir que o tratamento com a nebulização da infusão da Romã (*Punica granatum*) diminuiu significativamente a resposta inflamatória pulmonar, advinda da ação sistêmica de I/R-i em ratos, apresentando grande diferença em relação ao grupo controle.

Sendo assim, neste trabalho, é proposto a nebulização da infusão da Romã como uma terapia alternativa para limitar a injúria pulmonar causada pelo processo de isquemia e reperfusão intestinal. Demonstrando, assim, ser uma infusão com potencial para o desenvolvimento de entidades químicas antiinflamatórias.

REFERÊNCIAS

FERRO, C.O, *et al.* Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v.37, n.1, p.31-8, 2011.

GEISER, T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury-a translation approach. **Swiss Medical Weekly**, v.133, n.43-44, p.586-590, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14745653>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

JARDINI, F. A.; MANCINI F. J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum*, L.). **Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.43, n.1, p.137-147, Mar.2007.

LANGLEY, P. Why a pomegranate? . **British of Medicine Journal**, v.321, n.4, p.1153-4,2000.Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1118911>>. Acesso em: 16 out. 2014.

LANSK E.P; Newmann RA. *Punica granatum*(pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **J Ethnopharmacol**, v.109, p. 177-206, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157465>> Acesso em: 02 mar. 2015.

MATTIELLO, T. *et al.* Effects of pomegranate juice and extract polyphenols on platelet function. **Journal of Medicinal Food**, v.12, n.2, p.334-339, apr, 2009. Disponível em <<http://www.naturalpath-online.com/?sn=4195-2>>. Acesso em: 10 out. 2014.

MELO, Y.D. **Estudo do efeito antiinflamatório do LED sobre a inflamação pulmonar aguda em modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal em ratos**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale da Paraíba/FACID, São Paulo, 2010.

MENEZES, S.M.S. Atividades biológicas in vitro e in vivo de *Punica granatum* (Romã). **Revista Brasileira de medicina**.São Paulo, v.65, n.11, p.388-391, 2008.

Efeito antiinflamatório da romã (*punica granatum*) na síndrome do desconforto respiratório agudo

PIANTADOSI, C. A., SCHAWARTZ, D. A. The acute respiratory distress syndrome. **Annals of Internal Medicine**, v. 141, n.6, p. 460-470, 2004.

PINHEIRO, V.B; LISBOA, L.F.M.; HOLANDA, M.A. Fatores de Risco na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. **Pulmão RJ**, v.20, n.1, p.13-18, 2011. Disponível em:< http://www.sopterj.com.br/revista/2011_20_1/full.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2014.

ROCHA, S.L., *et al.* Gasometria arterial e inflamação pulmonar em diferentes tempos de sepse abdominal. **Arquivo Brasileiros de Cirurgia Digestiva**.São Paulo, v.20. n.1, p.28-33, 2007.

WERKMAN, C.; GRANATO, D.C. Aplicações terapêuticas da Punica granatum L. (romã). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.10, n.3, p.104-111, 2008.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functional and human disease. **International Journal of Biochemistry E Cell Biology**, São Paulo, v. 32, n.3, p.3- 41, 2006.