

**FELIPE LUKACIEVICZ BARBOSA**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO  
ETANÓLICO, DAS FRAÇÕES E DO COMPOSTO 8-METOXILAPACHENOL  
ISOLADO DOS TUBÉRCULOS OBTIDOS DE *Sinningia allagophylla***

**CURITIBA**

**2011**

**FELIPE LUKACIEVICZ BARBOSA**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO  
ETANÓLICO, DAS FRAÇÕES E DO COMPOSTO 8-METOXILAPACHENOL  
ISOLADO DOS TUBÉRCULOS OBTIDOS DE *Sinningia allagophylla***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

**Orientador:** Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

**CURITIBA**

**2011**

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Barbosa, Felipe Lukacievicz

Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico, das frações e do composto 8-metoxilapachenol isolado dos tubérculos obtidos de *Sinningia allagophylla*. / Felipe Lukacievicz. – Curitiba, 2011.  
73 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Aleksander Roberto Zampronio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Agentes antiinflamatórios 2. Atividade antinociceptiva 3. *Sinningia* I. Título II. Zampronio, Aleksander Roberto. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 583.87

## PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado "ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO, DAS FRAÇÕES E DO COMPOSTO 8-METOXILAPACHENOL ISOLADOS DOS TUBÉRCULOS OBTIDOS DE *Sinningia allagophylla*", de autoria do pós-graduando **FELIPE LUKACIEVICZ BARBOSA**, sob orientação do Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio e composta pelos professores: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio (UFPR), Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Geremias Chichorro (UFPR); Prof<sup>a</sup>. Dr. Yanna Dantas Rattmann (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 30 de novembro de 2011.



---

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio (UFPR)



---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Geremias Chichorro (UFPR)

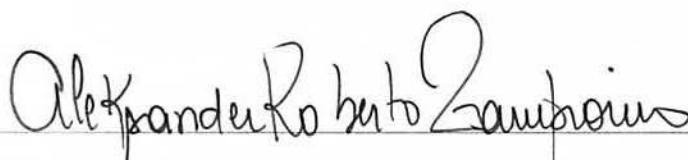


---

Dr<sup>a</sup> Yanna Dantas Rattmann (UFPR)

1 ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2 Ao trigesimo dia do mês de novembro do ano de dois mil e onze, às nove horas, no  
3 Anfiteatro do Departamento de fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade  
4 Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de  
5 autoria do pós-graduando em Farmacologia FELIPE LUKACIEVICZ BARBOSA,  
6 intitulada: "ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO  
7 EXTRATO ETANÓLICO, DAS FRAÇÕES E DO COMPOSTO 8-  
8 METOXILAPACHENOL ISOLADOS DOS TUBÉRCULOS OBTIDOS DE *Sinningia*  
9 *allagophylla* ", sob orientação do Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (UFPR) e  
10 composta pelos professores: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (UFPR); Prof<sup>ª</sup>. Dra.  
11 Juliana Geremias Chichorro (UFPR); Prof<sup>ª</sup>. Dr. Yanna Dantas Rattmann (UFPR). A Banca  
12 Examinadora iniciou os trabalhos. O candidato teve quarenta e cinco minutos para expor  
13 oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos  
14 membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No  
15 final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADO. De  
16 acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-  
17 graduando foi aprovado. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações  
18 sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o  
19 Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada  
20 pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 30  
21 novembro de 2011.



Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Orientador - UFPR)



Prof<sup>ª</sup>. Dra. Juliana Geremias Chichorro (UFPR)



Dr<sup>a</sup> Yanna Dantas Rattmann (UFPR)

Dedico esta dissertação aos meus pais Ademar e Ines, ao meu irmão Luciano. E a todos os meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que me deu ao longo da vida.

Aos meus pais Ademar e Inês, pelo apoio incondicional em minhas escolhas e pelo amor imensurável.

Ao meu irmão Luciano, pelo apoio e companherismo.

Ao Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio, pelos ensinamentos, pela ajuda, pela dedicação, paciência e pela oportunidade de trabalhar com ele.

A Profa. Dra. Maria Élide Stefanello e Dilamara Riva, do departamento de Química da UFPR, pelo fornecimento do extrato, das frações e do composto da *Sinningia alagophylla*.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, pelas ajudas e pelo conhecimento passado.

Aos animais pela evidente contribuição para esse trabalho e aos funcionários do biotério pela prestatividade.

Aos funcionários da Pós Graduação em Farmacologia e do departamento de Farmacologia pela contribuição.

Aos amigos: Haissa, Fernanda Lapa, Priscila, Ligia, Luisa, Alex Sandro e Rene pelas conversas, dicas, convivência e risadas.

As amigas Mariah e Francis, pela ajuda com a escrita da dissertação.

A todos que me ajudaram nos experimentos para a realização desse trabalho, principalmente Lidia e Gisele.

A todas as pessoas do laboratório de Inflamação, dor e febre, com as quais eu convivi por mais tempo.

A todos os meus amigos que de forma direta e/ou indireta me incentivaram ao longo de todo esse percurso, em especial a Cris, amiga para todas as horas.

A toda a minha família que também sempre torceu por mim.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“Sempre me pareceu estranho que todos aqueles que estudam seriamente uma ciência acabam tomados de uma espécie de paixão pela mesma. Em verdade, o que proporciona o máximo prazer não é o conhecimento e, sim, a aprendizagem, não é a posse, mas a aquisição; não é a presença, mas o ato de atingir a meta.”*

(Carl Friedrich Gauss)

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

(Fernando Pessoa)



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A RESPOSTA DE FASE AGUDA.....	01
1.2 AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR E VASODILATAÇÃO.....	03
1.3 DOR.....	05
1.3.1 Definição de Dor.....	05
1.3.2 Mecanismos para a Indução e Processamento da Dor.....	08
1.3.3 Dor Inflamatória.....	11
1.4 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS.....	15
1.5 PLANTAS MEDICINAIS – <i>Sinningia allagophylla</i> .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 ANIMAIS.....	25
3.2 MATERIAL BOTÂNICO, PREPARAÇÃO DO EXTRATO, FRACIONAMENTO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO ATIVO.....	25
3.3 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	29
3.4 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA.....	29
3.5 HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	30
3.6 TESTE DA PLACA QUENTE.....	31
3.7 DESEMPENHO MOTOR (ROTA-ROD).....	32
3.8 DROGAS E REAGENTES.....	33
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>4 RESULTADOS</b> .....	34
4.1 EFEITO DO EESAI NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA....	34

4.2 EFEITO DO EESAI NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA.....	36
4.3 EFEITO DO EESAI NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.....	38
4.4 EFEITO DAS FRAÇÕES E DO COMPOSTO 8ML SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	40
4.5 EFEITO DA FRAÇÃO EP E DO COMPOSTO 8ML NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.....	43
4.6 EFEITO LOCAL DO COMPOSTO 8ML NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.....	45
4.7 EFEITO DO EESAI E DO COMPOSTO 8ML NO TESTE DE PLACA QUENTE E NO DESEMPENHO MOTOR (“ROTA-ROD”).....	47
4.8 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E PE-G <sub>2</sub> .....	49
4.9 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CINC-1 E DOPAMINA.....	51
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- SEQUÊNCIA DE LIBERAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS INICIADOS PELA CARRAGENINA (CUNHA, <i>et al.</i> , 2005).....	15
FIGURA 2	- ALGUMAS DAS SUBSTÂNCIAS QUE FORAM ISOLADAS DA <i>Sinningia ssp</i> .....	22
FIGURA 3	- FLORES <i>Sinningia allagophylla</i> (Martius) Wiehler.....	23
FIGURA 4	- EXTRAÇÃO, PARTIÇÃO E FRACIONAMENTO DOS TUBÉRCULOS de <i>Sinningia allagophylla</i> .....	26
FIGURA 5	- NOVA PARTIÇÃO E FRACIONAMENTO DOS TUBÉRCULOS de <i>Sinningia allagophylla</i> .....	27
FIGURA 6	- ESTRUTURA DO COMPOSTO LAPACHENOL.....	27
FIGURA 7	- ESTRUTURA DO COMPOSTO 8-METOXILAPACHENOL.....	28
FIGURA 8	- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO 8ML (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	28
FIGURA 9	- EFEITO DO EESAI SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.....	35
FIGURA 10	- EFEITO DO EESAI SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA FORMALINA EM CAMUNDONGOS.....	37
FIGURA 11	- EFEITO DO EESAI SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.....	39

FIGURA 12	- EFEITO DAS FRAÇÕES E DO COMPOSTO 8ML SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.....42
FIGURA 13	- EFEITO DA FRAÇÃO EP E DO COMPOSTO 8ML SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.....44
FIGURA 14	- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.....46
FIGURA 15	- EFEITO DO EESAI E DO COMPOSTO 8ML NO TESTE DE PLACA QUENTE E NO DESEMPENHO MOTOR (“ROTA-ROD”) EM CAMUNDONGOS.....48
FIGURA 16	- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E PGE $_2$ EM CAMUNDONGOS.....50
FIGURA 17	- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CINC-1 OU DOPAMINA EM CAMUNDONGOS.....52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% MPE	-	% Máximo de Efeito Possível
<sup>13</sup> C	-	Carbono 13
<sup>1</sup> H	-	Hidrogênio
8ML	-	8-METOXILAPACHENOL
AINEs	-	Anti-inflamatórios não Esteroidais
AS	-	Aminas Simpatomiméticas
ATP	-	Trifosfato de Adenosina
BK	-	Bradicinina
Cg	-	Carragenina
CINC-1	-	Quimioatraente para Neutrófilos Induzidos por Citocinas 1
COX	-	Ciclooxigenase
DA	-	Dopamina
Dex	-	Dexametasona
EESAI	-	Extrato Etanólico da <i>Sinningia alagophylla</i>
EP	-	Fração Éter de Petróleo
GABA	-	Ácido Gama-aminobutírico
GR	-	Receptores de Glicocorticóides
GRD	-	Gânglios da Raiz Dorsal
i.pl.	-	intraplantar
IASP	-	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IL	-	Interleucina

Indo	-	Indometacina
LOX	-	Lipooxigenase
MeOH	-	Fração Metanólica
MIP-1	-	Proteína Inflamatória Derivada de Macrófagos–1
MPO	-	Mieloperoxidase
NF-kB	-	Fator Nuclear kappa B
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PAF	-	Fator de Agregação Plaquetária
PBS	-	Tampão Fostato-Salino
PFA	-	Proteínas da Fase Aguda
PPPF	-	Fator Pirogênico Pré-Formado em Macrófago
PGs	-	Prostaglandinas
PMN	-	Polimorfonucleares
QQ	-	Quimiocina Derivado de Queratinócito
RFA	-	Resposta de Fase Aguda
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SNP	-	Sistema Nervoso Periférico
TNF- $\alpha$	-	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
v.o.	-	Via oral
Vei	-	Veículo

## RESUMO

Os organismos vivos estão em contato com vários agentes que podem causar danos à saúde e por isso eles são dotados de mecanismos de defesa destinados a conter ou reduzir os danos causados por esses agentes e, eventualmente, eliminá-los. Dentre esses mecanismos, há a reação inflamatória. Esta reação é caracterizada por sinais como calor, rubor, dor, edema e perda de função. Existem vários analgésicos usados para o tratamento de uma ampla gama de situações dolorosas e inflamatórias. No entanto, devido ao grande número de efeitos colaterais e muitas vezes da ineficácia das drogas que são usadas para tratar a inflamação e dor, existe uma busca por novas drogas que são mais seguras e mais eficazes. *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehl recebe os nomes populares de cravo-do-campo, batatinha-do-campo ou batata-de-perdiz e é a única espécie do gênero considerada medicinal. Os tubérculos são usados com emolientes e tônicos, enquanto que as flores e folhas são usadas como diurético, febrífugo e purificador. No estudo, foram utilizados o extrato etanólico (EESAI) (3-100mg/kg), as frações metanólica (MEOH) (30mg/kg) e éter de petróleo (EP) (3mg/kg) e o composto 8-metoxilapachenol (8ML) (1,8mg/kg) no modelo de edema de pata induzido por carragenina, de nocicepção induzida por formalina e de hiperalgisia mecânica induzida por carragenina, todos com administração via oral. O EESAI diminuiu o edema (redução máxima de 55% na quarta hora) reduziu a fase inflamatória da formalina e a hiperalgisia mecânica induzida pela carragenina (com inibições máximas de 65% e 100%, respectivamente). A fração EP e o composto 8ML também diminuíram o edema (redução máxima de 48 e 59%, respectivamente) e a hiperalgisia mecânica (com redução máxima de 89% para a fração e 100% para o composto). Portanto o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do EESAI, parece ser em parte em virtude da ação do composto 8ML. Nem o EESAI nem o composto 8ML causaram uma mudança no desempenho motor dos animais no rota-rod ou na resposta dos animais no teste de placa quente. Portanto, aparentemente o composto age somente na periferia e não atua no sistema nervoso central. A injeção local do composto 8ML (0,75-750pg/pata) reduziu de maneira dose-dependente a hiperalgisia mecânica induzida pela carragenina quando o composto foi administrado na pata ipsilateral, mas não na pata contra-lateral possuindo portanto um efeito local. O composto 8ML inibiu a hiperalgisia induzida por fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e prostaglandina (PG)E<sub>2</sub>, mas não modificou a hiperalgisia induzida pelo quimioatraente para neutrófilos induzido por citocinas 1 (CINC-1) e nem pela dopamina sugerindo que o mecanismo de ação deste composto esteja relacionado com a sensibilização do nociceptor provocada pelo componente prostaglandina.

## ABSTRACT

Living organisms are in contact with several agents that can impair health and so they are endowed with defense mechanisms designed to contain or reduce the damage caused by these agents, and eventually eliminate them. Among these mechanisms, there is the inflammatory response. This response is characterized by signs such as warmth, redness, pain, swelling and loss of function. There are several analgesics used for the treatment of a wide range of painful and inflammatory conditions. However, due to the large number of side effects and often ineffectiveness of drugs that are used to treat inflammation and pain, there is a search for new drugs that are safer and more effective. *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehl popularly known as cravo-do-campo (carnation field), batatinha-do-campo (potato field) ou batata-de-perdiz (potato partridge) and it is the only species of the genus considered medicinal. The tubers are used as an emollient and tonic, while the flowers and leaves are used as febrifuge, diuretic and cleanser. In this study, we used the ethanol extract (EESAI) (3-100mg/kg), the methanol (MEOH) (30mg/kg) and petroleum ether (PE) (3mg/kg) fractions and the compound 8-metoxiLapachenol (8ML ) (1.8mg/kg) in the model of paw edema induced by carrageenan, nociception induced by formalin and carrageenan-induced mechanical hyperalgesia, all with oral administration. The EESAI reduced the swelling, maximum reduction of 55% at the fourth hour, reduced the inflammatory phase of formalin and mechanical hyperalgesia induced by carrageenan (reductions of up to 65% and 100%, respectively). The EP fraction and the compound 8ML also reduced edema, (maximum reduction of 48 and 59%, respectively) as well as the mechanical hyperalgesia, with maximum reduction of 89% (PE) and 100% (8ML). Therefore the anti-inflammatory and antinociceptive effect of EESAI, seems to be partly due to the action of the compound 8ML. Neither compound 8ML nor EESAI caused a change in motor performance of the animals in the rota-rod test nor in the response of animals in hot plate test. Thus it seems that the compound acts only on the periphery and not in the central nervous system. The local injection of the compound 8ML (0.75-750pg/paw) reduced in a dose-dependent manner the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan when the compound was applied to the ipsilateral paw, but not in the contralateral paw therefore acting locally. The compound 8ML inhibited the hyperalgesia induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and prostaglandin (PG) $E_2$ , but did not modify the hyperalgesia induced by chemokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 and by dopamine suggesting that the mechanism of action of this compound is related to the sensitization of the nociceptor via the prostaglandin component.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A RESPOSTA DE FASE AGUDA

Diariamente os seres vivos estão em contato com inúmeros agentes que podem causar diversos danos à própria saúde. Dentre eles, temos vírus, bactérias, fungos, agentes químicos, entre outros. Visando diminuir os danos causados pelos invasores, os organismos são dotados de estruturas e sistemas de defesa. Um desses mecanismos é a reação inflamatória (CRONSTEIN e WEISSMANN, 1995; BLATTEIS, 2006).

A reação inflamatória desenvolve-se rapidamente no local de invasão do agressor para a proteção do ser vivo desse ataque (BLATTEIS, 2006). Ela também restaura a homeostase do tecido agredido, atuando através do isolamento, da diluição e/ou da destruição do agente agressor (GALLIN *et al.*, 1992). Esse processo foi descrito pela primeira vez por Cornelius Celsius, há mais de 2.000 anos. Cornelius também já descreveu alguns sinais cardinais da inflamação que ainda são utilizados: calor, rubor, dor e edema. Hoje em dia é usado também um quinto sinal cardinal, descrito por Virchow, que é a perda de funções (TROWBRIDGE, 1997; ROCK e KONO, 2008).

Apesar de em sua fase inicial a resposta inflamatória ser localizada, a magnitude desta resposta pode ser tal que os mediadores liberados no local acabam por alcançar a circulação sanguínea desencadeando um sistema complexo de reações organizadas, que são coletivamente chamadas de resposta de fase aguda (RFA). Esta resposta é caracterizada por sinais e sintomas como febre, aumento da produção de proteínas da fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, alteração nas concentrações plasmáticas de metais como ferro, zinco e cobre (STADNYK e GAULDIE, 1991). Muitos autores se referem a esta resposta como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS), evidenciando as conseqüências sistêmicas da resposta inflamatória.

Essa reação é iniciada e mediada por citocinas inflamatórias que são secretadas por uma grande variedade de tipos celulares como leucócitos polimorfonucleares, monócitos/macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, células da glia, entre outras (ZEISBERGER, 1999).

Durante a RFA ou SRIS uma série de alterações bioquímicas e celulares ainda pode ser observada, em particular a síntese das chamadas proteínas da fase aguda (PFA). PFA é o nome dado a aproximadamente 30 diferentes proteínas que aumentam ou diminuem sua concentração plasmática aproximadamente 90 minutos após o início do processo inflamatório. Ao agirem como mediadores e inibidores do processo inflamatório, as PFA regulam as respostas imunológicas (ZEISBERGER, 1999).

Citocinas são as proteínas solúveis que modulam o sistema imune no início da RFA. Elas podem ser divididas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por direcionar e desencadear o processo inflamatório. Já as anti-inflamatórias são responsáveis por garantir proteção contra uma reação exagerada e também pela resolução do processo inflamatório. Dentre os mediadores anti-inflamatórios, pode-se citar a Interleucina (IL)-10, e entre as pró-inflamatórias têm-se as Interleucinas(IL)-1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ), o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), o fator pirogênico pré-formado em macrófago (PFPP), a proteína inflamatória derivada de macrófagos-1 (MIP-1), dentre outras (KUBES, 1993).

Iniciado o processo, ele pode ser resolvido de maneira adequada visando eliminar e neutralizar o agente agressor. Também ocorre a restauração do tecido agredido. O processo de resolução também normaliza a permeabilidade vascular, envolve a apoptose dos neutrófilos presentes no sítio de infecção, remoção dos corpos apoptóticos, entre outros. Esses episódios contam com a participação dos macrófagos, que vão reconhecer e fagocitar os neutrófilos apoptóticos de maneira não agressiva ao tecido (KUMAR *et al.*, 2005; WEIGERT *et al.*, 2009).

Diferentemente do que se pensava há algum tempo, o processo de resolução da inflamação é bastante ativo e depende da ação de uma série de mediadores pró-resolutivos e anti-inflamatórios tais como lipoxinas, prostaglandinas (PGs) ciclopentenonas, anexina I, resolvinas e mediadores da apoptose. As enzimas envolvidas na síntese dos mediadores inflamatórios, como a ciclooxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX), também estão envolvidas na síntese desses mediadores pró-resolutivos. Dessa maneira, esses mediadores podem ser importantes alvos para fármacos anti-inflamatórios (GILROY *et al.*, 2004; SERHAN *et al.*, 2007).

Passaremos então a descrever com um pouco mais de detalhes alguns dos eventos que ocorrem durante esta resposta inflamatória, particularmente o edema e

a dor, com informações que consideramos essenciais para o entendimento do nosso trabalho.

## 1.2 AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR E VASODILATAÇÃO

Com o estímulo inflamatório agudo, ocorrem rapidamente a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Há um aumento do fluxo sanguíneo no local devido ao processo de vasodilatação arteriolar, caracterizando os sinais de calor e rubor. Essa vasodilatação é mediada principalmente pela ação de aminas vasoativas, como a histamina e serotonina, pela presença de peptídeos vasoativos, como a substância P e bradicinina e também por ação de prostaglandinas (KUMAR *et al.*, 2005). A histamina é uma amina vasoativa encontrada principalmente nos mastócitos, já a serotonina encontra-se principalmente nas células enterocromafins e nas plaquetas. A histamina vai agir principalmente nos receptores do tipo H1 na microcirculação promovendo assim a vasodilatação das arteríolas e o aumento da permeabilidade vascular. A histamina também induz a síntese de prostaciclina e a liberação de óxido nítrico pelo endotélio. A ação da serotonina também é dependente de óxido nítrico (KUMAR *et al.*, 2005). A substância P é armazenada em vesículas secretórias e é liberada por neurônios sensoriais. Sua ação resulta na liberação de histamina pelo mastócito. Já a bradicinina, um peptídeo vasoativo, é formada no plasma e além de sua função vasoativa também está envolvida no processo da dor. Já a ação das prostaglandinas depende da mobilização do ácido araquidônico (AA). O AA é liberado dos fosfolípidos da membrana celular e quando passa por metabolização através da via da cicloxigenase, forma os prostanóides, como a PGE<sub>2</sub>, que irá exercer várias funções na microcirculação, incluindo a vasodilatação e o controle do fluxo sanguíneo (HARIZI *et al.*, 2008).

Alguns destes mediadores como a histamina, a bradicinina e a substância P também geram um aumento nos espaços intercelulares na porção venular, resultando em um aumento da permeabilidade celular na barreira endotelial. Esses processos promovem a redução da velocidade do fluxo sanguíneo, uma exsudação de plasma rico em proteínas e fluido para o espaço extravascular, caracterizando o edema durante a inflamação aguda (KUMAR *et al.*, 2005). O extravasamento de proteínas e líquidos é normal durante o processo inflamatório e ocorre

predominantemente em vênulas pós capilares, sendo importante também para a formação da linfa e para a ação do sistema imune. Vários mediadores inflamatórios podem rapidamente aumentar a permeabilidade microvascular de macromoléculas através do endotélio venular (DURAN *et al.*, 2010).

O processo de permeabilidade vascular ocorre entre as células, chamado de permeabilidade paracelular, ou através das células, conhecido como permeabilidade transcelular. Essa permeabilidade, por sua vez, se faz de três formas distintas. A primeira é de maneira vascular basal, que se refere ao fluxo rápido de moléculas pequenas como água e sais e pela passagem limitada de proteínas do plasma através dos capilares normais. Também existe a hiperpermeabilidade vascular aguda, que diz respeito à passagem extensa, mas por tempo limitado, de plasma e proteínas plasmáticas em vênulas na inflamação aguda. A terceira é a hiperpermeabilidade vascular crônica, referindo-se ao extenso extravasamento de proteínas plasmáticas e plasma a partir de tumores, feridas de cicatrização e inflamação crônica. Em todos esses casos, a barreira que deve ser cruzada inclui as células endoteliais, membrana basal vascular e pericitos. A massa de plasma e solutos que atravessam a parede vascular depende de três fatores diferentes: gradientes de pressão e concentração; forças hemodinâmicas, como por exemplo, o fluxo sanguíneo e a área vascular disponível para a troca; e da permeabilidade intrínseca da parede vascular (NAGY *et al.*, 2008; DVORAK, 2010).

O mecanismo mais comum, pelo qual os mediadores inflamatórios promovem o aumento da permeabilidade vascular, dá-se a partir da retração das células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares. Assim, quando essas células se contraem, as junções intercelulares se desfazem, possibilitando o extravasamento plasmático. Em contrapartida, existem outros mecanismos que podem permitir o aumento da permeabilidade vascular como lesões das células endoteliais mediadas por leucócitos, lesões endoteliais diretas, retração das células endoteliais com o envolvimento do citoesqueleto e extravasamento através de capilares em regeneração (MEHTA e MALIK, 2006).

## 1.3 DOR

### 1.3.1 Definição de Dor

A principal razão pela qual os pacientes procuram atendimento médico é a dor. A sensação de dor nos alerta para uma lesão real ou iminente e aciona respostas adequadas de proteção. Devido a sua grande importância clínica, essa modalidade sensorial atrai grande interesse de estudos na comunidade científica. Existem, na literatura, várias definições sobre dor. Porém, devido a sua característica de ser uma experiência muito individual e subjetiva, é muito difícil encontrar uma única definição, apesar de tudo o que já se conhece sobre o assunto. Em termos moleculares, a experiência da dor no sentido clínico com todos os seus componentes afetivos de desagrado e sofrimento ainda não pode ser totalmente compreendida. Mesmo assim, há muito estudo para tentar desvendar o processo pelo qual a dor se inicia e se propaga bem como a tentativa de definição da forma mais abrangente possível.

A dor é extremamente necessária à sobrevivência e manutenção do organismo, já que, além de detectar estímulos nocivos que podem acarretar em alguma lesão tecidual, ela pode também desencadear vários comportamentos de proteção a um tecido já lesionado, ajudando inclusive no processo de resolução da resposta inflamatória desse tecido (MARKENSON, 1996; MILLAN, 1999; COSTIGAN e WOOLF, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004).

A dor é uma experiência complexa envolvendo não só a transdução do estímulo nocivo, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo, segundo JULIUS e BASBAUM (2001). A sensação de dor possui algumas funções como a de perceber que um determinado estímulo ocasiona um dano tecidual, a de avisar ao indivíduo da probabilidade iminente de uma lesão no tecido e a de alertar um grupo de indivíduos de perigo assim que ele surgir para um de seus membros (LE BARS *et al.*, 2001).

Apesar de a dor ser uma sensação um tanto desagradável, ela é fundamental para a sobrevivência do organismo, tendo uma importante função de proteção. Assim que o mecanismo de alerta é constituído, a dor pode promover uma resposta comportamental generalizada com retornos endócrinos, tais como secreção de cortisona e ativação simpática, podendo ocasionar uma taquicardia e hipertensão

arterial que, juntos com uma analgesia transitória, ajudam a melhora do desempenho dos repertórios comportamentais, possibilitando dessa forma o êxito no afastamento de situações de risco (MILLAN, 1999).

A dor e suas manifestações podem ser compreendidas com base nos substratos neurais que intercedem às funções sensoriais e afetivas. O sistema sensorial percebe a localização espaço-temporal, a qualificação física e a intensidade do estímulo nocivo. Já o componente cognitivo-afetivo atribui emoções à experiência, tendo responsabilidade pelas respostas comportamentais à dor (ALMEIDA *et al.*, 2004). A dor tem, portanto, uma intenção individual e sofre a influência de experiências anteriores. Ela pode se manifestar de duas formas: uma é a resposta de aviso requerida para a sobrevivência no ambiente hostil e perigoso e a outra é resultado de mudanças no sistema nervoso, podendo ser patológica. Essa última é responsável pelo sofrimento insistente de milhões de pacientes, sendo também a causa das buscas constantes para tratar a dor (WOOLF, 2000). Pode-se dizer, dessa maneira, que a dor insistente perde sua função como sistema de aviso protetor e torna-se debilitante e crônica. A dor contribui para determinar um estado de hipersensibilidade localizada dentro e ao redor da região lesada. Um estímulo que acarretaria normalmente apenas uma sensação inócua torna-se desconfortável e acaba causando inúmeros transtornos na qualidade de vida das pessoas (WOOLF, 2000; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Apesar das diversas definições existentes para descrever a dor, uma das que descreve de forma mais completa é referente à Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP do inglês, *International Association for the Study of Pain*), que em 2011, conceituou-a como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões.” Além dessa definição, existe uma classificação da dor, que leva em consideração alguns parâmetros como a localização central ou periférica, a duração e se ela é fisiológica ou não. No que se refere à duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A primeira é caracterizada por ser pontual, delimitada e desaparecer com a resolução do processo patológico. Já a segunda persiste por um longo período de tempo, sendo associada a processos patológicos crônicos e mudanças no padrão de transmissão neuronal (ALMEIDA *et al.*, 2004; LENT, 2004).

É de fundamental importância saber diferenciar o termo “dor” de “nocicepção”, “hiperalgesia” e “alodinia”. Com relação à definição de dor da IASP (2011), podemos dizer que a dor apresenta dois componentes: o sensorial e o emocional; e o termo “nocicepção” refere-se apenas ao componente sensorial. Os receptores da dor, também conhecidos como nociceptores, que segundo a IASP (2011) são definidos como terminações nervosas de alto limiar sensorial do sistema nervoso periférico somatossensorial capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos. O termo nocicepção é definido como sendo o processo neural de codificação e processamento dos estímulos nocivos (IASP, 2011). Assim, a nocicepção depende da ativação de receptores específicos e vias neuroanatômicas que fazem a comunicação entre o Sistema Nervoso Periférico (SNP) e o SNC (RUSSO e BROSE, 1998). Isso significa que, enquanto a dor representa uma percepção subjetiva com uma dimensão emocional, a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao SNC da existência da lesão. Pode-se dizer também que nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas por estímulos nocivos – já a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial (LOESER e MELZACK, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004).

A ativação de nociceptores periféricos ocasiona a dor, gerando um potencial de ação que resulta na liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato. No entanto, mesmo que não haja uma ativação do nociceptor, pode ocorrer ainda uma diminuição no limiar da resposta da fibra nociceptiva e de nociceptores circundantes, o que chamamos de sensibilização dos nociceptores. Além disso, nociceptores silenciosos, que normalmente não são ativos, são recrutados após um dano tecidual e passam a responder a uma variedade de estímulos. Uma vez ativados, estes nociceptores previamente silenciosos se tornam sensibilizados e respondem a estímulos nocivos de forma mais intensa (DRAY e BEVAN, 1993; LOESER e MELZACK, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). Acontece então um aumento da sensibilidade à dor, clinicamente denominada de hiperalgesia, ou dor anormalmente intensa, produzida por estímulos que normalmente produzem dor. Isto significa que o aumento da sensibilidade à dor é normalmente decorrente de consideráveis mudanças inicialmente no processo periférico e posteriormente, no

processo central de sinalização da dor. Outras alterações sensoriais também podem ocorrer, entre elas a alodinia. Essa, por sua vez, é um fenômeno similar ao de sensibilização das fibras nociceptivas mas manifesta-se frente a um estímulo não lesivo ou não doloroso, ou seja, dor em resposta a um estímulo não nociceptivo. A alodinia é mediada pela ativação periférica de receptores sensíveis ao estímulo tátil que sofrem modificações e passam a ser capazes de estimular o processo nociceptivo central (LOESER e MELZACK, 1999; MILLAN, 1999; SANDKUHLER, 2009).

### 1.3.2 Mecanismos para a Indução e Processamento da Dor

A dor inicia-se com o estímulo nociceptivo, que ativa ou sensibiliza os nociceptores, que então levam a informação da periferia para o SNC através das fibras nociceptivas (SANDKUHLER, 2009). As fibras aferentes de primeira ordem foram classificadas em termos de estrutura, diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução em A $\alpha$  e A $\beta$ , A $\delta$  ou C (COSTIGAN e WOOLF, 2000; JULIUS e BASBAUM, 2001). Dessa maneira, as fibras A $\alpha$  e A $\beta$  representam proprioceptores e receptores mecânicos de baixo limiar e são especializadas na condução do estímulo mecânico inócuo. Essas fibras são altamente mielinizadas, com diâmetro maior que 40  $\mu$ m e velocidade de condução de 30-100 m/s e são particularmente abundantes na derme e epiderme. Por outro lado, as fibras A $\delta$  e C possuem diâmetros menores e terminações nervosas periféricas livres. Elas apresentam um alto limiar de ativação e são responsáveis por detectar estímulos nocivos, sendo denominadas de nociceptores. As fibras aferentes A $\delta$  são pouco mielinizadas, variando em seu diâmetro entre 2,0-6,0  $\mu$ m e têm velocidade de transmissão intermediária de 12-30 m/s. Já as Fibras C são não mielinizadas, possuem diâmetro entre 0,4-1,2  $\mu$ m e mostram uma velocidade de condução de 0,5-2,0 m/s. As fibras C são condutoras da dor lenta e difusa (TREEDE *et al.*, 1990; KRESS *et al.*, 1992; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Há duas classes principais de nociceptores do tipo A $\delta$  que são I e II. As duas respondem a estímulos mecânicos intensos, mas podem ser distinguidas por sua capacidade de responder a estímulos de calor intenso ou quando são afetadas pela lesão tecidual. As fibras A $\delta$  do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C,



enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43°C. A maioria das fibras C também é polimodal. Algumas são insensíveis a estímulos mecânicos, mas respondem ao calor nocivo. É indispensável saber que a maioria das fibras C também responde a estímulos nocivos de origem química, como ácidos. Porém, é difícil identificar o estímulo natural de alguns nociceptores, os chamados “nociceptores silenciosos” ou “adormecidos”, que passam a ser ativados somente quando são sensibilizados por lesão tecidual (SCHMIDT *et al.*, 1995; GEBHART, 1996; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor aguda, pontual e bem localizada em geral refletem a ativação de fibras A $\delta$ , que conduzem a dor primária, com estreita correlação com o estímulo e precisa localização espacial. A nocicepção difusa e lenta, por sua vez, é conduzida por fibras C, tais como dor secundária, que continua mesmo após o estímulo nocivo ter encerrado, dor de difícil localização, dor relacionada ao sofrimento e dor em queimação. A dor visceral frequentemente é pouco localizada, profunda e lenta, não sendo necessária lesão tecidual para sua existência (SNIDER e MCMAHON, 1998; JULIUS e BASBAUM, 2001; LENT, 2004).

O estímulo, após a transdução, é transmitido através das fibras A $\delta$  e C, que se incorporam aos demais nervos periféricos e penetram na medula através dos nervos espinhais e no tronco encefálico através do nervo trigêmeo. Os corpos dos neurônios primários localizam-se nos gânglios da raiz dorsal e no gânglio do trigêmeo. A maioria dos neurônios sensoriais de segunda ordem situa-se no corno dorsal da medula e no núcleo espinhal do trigêmeo, onde recebem as sinapses dos aferentes de primeira ordem (LENT, 2004). Situados na coluna vertebral e dispostos lateralmente ao longo da medula espinhal, os gânglios da raiz dorsal contém ainda células dendríticas e macrófagos, além de uma rica rede de capilares sanguíneos que apresentam propriedades diferentes da barreira hematoencefálica do SNC (OLSSON, 1990).

Deste modo, os estímulos nociceptivos de origem mecânica, térmica ou química podem ativar canais iônicos específicos presentes nos terminais periféricos de fibras aferentes nociceptivas, gerando correntes despolarizantes que, dependendo da intensidade, iniciam os disparos dos potenciais de ação por ativação de canais de sódio sensíveis a voltagem. Sabe-se que, uma vez ativadas, as fibras

aferentes primárias liberam vários neurotransmissores, por exemplo, glutamato e substância P, que por sua vez irão ativar neurônios secundários específicos, localizados em lâminas de Rexed na medula espinhal. A organização arquitetônica da medula espinhal permite distinguir anatomicamente onde cada tipo de fibra aferente primária termina, sendo que as lâminas de I a VI fazem parte do corno dorsal, as lâminas VII, VIII e IX constituem o corno ventral e a lâmina X representa as células organizadas ao redor do canal medular. Dessa maneira, as fibras A $\beta$ , que produzem informações não-nociceptivas, terminam principalmente nas lâminas III e IV, enquanto que as fibras nociceptivas A $\delta$  e C projetam-se nas lâminas I e II, tornando-as importantes sítios de regulação da informação nociceptiva (BESSION e CHAOUCH, 1987; MILLAN, 1999).

Neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem, a partir destas regiões, são acionados na medula espinhal, sendo que alguns são ativados somente por estímulos nocivos, específicos para a nocicepção, e outros respondem a estímulos de alta ou baixa intensidade, limiar dinâmico e amplo. Os neurônios nociceptivos de segunda ordem também apresentam grande diversidade funcional. Quando presentes nas lâminas I e II são denominados nociceptivos específicos, pois possuem alto limiar de excitabilidade e fazem sinapses com fibras A $\delta$  e C. Já os neurônios que fazem sinapses nas lâminas IV e V são excitados por estímulos de intensidade variada e são denominados neurônios de faixa dinâmica ampla. Fibras aferentes primárias podem ainda fazer sinapses com neurônios não-nociceptivos, localizados nas lâminas II, III e IV. A transmissão da informação nociceptiva pode ser regulada negativamente por interneurônios inibitórios, que fazem sinapses na lâmina II, também conhecida como substância gelatinosa, onde liberam neurotransmissores e neuromoduladores tais como o ácido gama-aminobutírico (GABA), encefalinas e glicina, entre outros (TREEDE *et al.*, 1990; KRESS *et al.*, 1992; MILLAN, 1999).

Dentro da medula, os neurônios de segunda ordem emitem axônios que cruzam para o lado oposto e se incorporam ao feixe espinotalâmico na coluna anterolateral da medula e ascendem até o tronco encefálico encontrando fibras de segunda ordem do núcleo espinhal do trigêmeo, formando o lemnisco espinhal. Até aqui, as fibras A $\delta$ , dor rápida, estão misturadas às C, dor lenta. Alguns anatomistas distinguem entre o feixe neoespinotalâmico, impulsos da dor rápida, e o feixe

paleoespinotalâmico ou espino-reticulo-talâmico, impulsos da dor lenta, que se dirigem ao tálamo, passando pela formação reticular. Fibras do sistema nociceptivo mais antigo terminam em regiões do tronco encefálico, como na formação reticular e na substância cinzenta periaquedutal, promovendo reações comportamentais e fisiológicas da dor. Os impulsos da dor rápida vão para os núcleos talâmicos posteriores e ventral posterior, onde estão os neurônios de terceira ordem cujos axônios projetam ao córtex somato-sensorial primário. Isso caracteriza a via direta da dor rápida com três neurônios e duas sinapses antes do córtex (TREEDE *et al.*, 1990; KRESS *et al.*, 1992; MILLAN, 1999; LENT, 2004).

As fibras secundárias se dirigem ao tálamo e à área somato-sensorial primária e também para diversas outras regiões do SNC que controlam os fenômenos vegetativos e emocionais. Algumas fibras de segunda ordem projetam aos neurônios do sistema reticular ascendente, formação reticular, outras projetam a núcleos do sistema límbico e tálamo. As informações nociceptivas chegam também ao córtex cingulado anterior, além do córtex somato-sensorial (LENT, 2004).

Com relação à modulação do estímulo nocivo, pode ocorrer a inibição ou facilitação seletiva dos sinais nociceptivos que chegam ao corno dorsal da medula espinhal (REN e DUBNER, 2002). O sistema de modulação endógeno é constituído de interneurônios nas camadas superficiais da medula espinhal na qual há participação de peptídeos endógenos tais como endorfinas, encefalinas e dinorfinas, cuja função é modular as sinapses nociceptivas, bloqueando a liberação de neurotransmissores excitatórios pelo terminal pré sináptico e hiperpolarizando a membrana pós sináptica. Todos esses peptídeos endógenos são encontrados na substância cinzenta periaquedutal, nos núcleos da rafe e no corno dorsal da medula (LENT, 2004).

### 1.3.3 Dor Inflamatória

É comum um processo inflamatório estar relacionado aos mecanismos que envolvem a nocicepção, como já explicitado anteriormente. A dor associada a processos inflamatórios é resultante de mudanças funcionais em nociceptores, cujos corpos celulares estão localizados no gânglio dorsal, perto da medula espinhal (BATTAGLIA e RUSTIONI, 1988). Os sinais cardinais da inflamação aguda – rubor,

edema, calor, dor e perda de funções – surgem como consequência das alterações, muitas delas neuroativas, do microambiente da área lesada, devido à liberação de vários mediadores químicos nesta área. Essas substâncias estimulam nociceptores quimiosensíveis, que induzem o desenvolvimento da dor inflamatória. Algumas substâncias endógenas, que são produzidas pelas células que sofreram algum tipo de lesão, como a substância P (produzida por neurônios), produzem um efeito excitatório podendo agir juntamente com a bradicinina (BK), que por sua vez é produzida no plasma. Já outras substâncias agem principalmente na via de sensibilização, como algumas citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) ou prostaglandinas, que são derivadas do AA, ou ainda aminas simpáticas que são liberadas pelos terminais nervosos. A sensibilização diminui o limiar de despolarização dos nociceptores, consequentemente tornando-o responsivo a uma intensidade menor de estímulo (COUTAUX *et al.*, 2005).

Portanto, a dor inflamatória pode ser produzida por fenômenos independentes ou interdependentes. Alguns desses fenômenos podem agir através da estimulação direta de nociceptores, e outros dependem de mediadores que agem em tipos específicos de nociceptores ou então produzem modificações na via nociceptiva central. Portanto, a dor inflamatória é resultado de uma complexa inter-relação de sistemas que estão envolvidos na inflamação. Sistemas como os enzimáticos prostanoídes ou o de cininas (LEVINE *et al.*, 1986; SCHAIBLE e SCHMIDT, 1988; BIRRELL *et al.*, 1991; DRAY, 1995; 1997). Esses sistemas enzimáticos podem interagir com outros sistemas como o de fator de crescimento neural (DRAY e BEVAN, 1993; FERREIRA, 1993; DRAY, 1995). Os sistemas enzimáticos também podem interagir com algumas células, entre elas: polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos, além de produtos neuronais como neuropeptídeos entre outros (DRAY, 1995). Enquanto não ocorre a resolução deste processo inflamatório, os sinais cardinais da inflamação persistem.

A amplificação do sinal nociceptivo é produzida não somente pelas substâncias liberadas por células do sistema mononuclear fagocitário ou advindas do plasma no local da inflamação, mas também por substâncias liberadas pelas fibras nociceptivas adjacentes ao local da lesão como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, fenômeno este conhecido como inflamação neurogênica. Desta forma, a fibra aferente primária contribui para a liberação de

vários neuropeptídeos, que por sua vez causam uma vasodilatação que favorece o extravasamento proteico e resulta no que se conhece como “sopa inflamatória”. Este conjunto de interações neuroquímicas serve de base para a hiperalgesia e é possível classificar como hiperalgesia primária a hiperalgesia originária do dano tecidual propriamente dito e como hiperalgesia secundária aquela que ocorre ao redor do tecido danificado por extravasamento destes neuropeptídeos para o tecido saudável (COUTAUX *et al.*, 2005).

Portanto esses mediadores podem ser originados de várias fontes. Os mais importantes são no sistema vascular, nas células imunes, no tecido lesado e nos tecidos adjacentes, nos nervos sensoriais e nos nervos simpáticos. Esses mediadores atuam em seus respectivos receptores que por sua vez estão amplamente distribuídos no organismo. Alguns destes receptores são acoplados a proteína G e induzem a formação de segundos mensageiros. Outros receptores são acoplados a canais iônicos que regulam a permeabilidade e a concentração celular de íons.

Vários pesquisadores estudam como essa liberação de mediadores ocorre nos animais, para assim entender melhor esse fenômeno complexo e também tentar descobrir novos alvos terapêuticos. Cunha *et al.*, 2005 propuseram uma cascata de liberação de mediadores inflamatórios na hipernocicepção inflamatória em modelos animais. Esse grupo utiliza o termo hipernocicepção para definir a sensibilização de nociceptores ao invés de tentar diferenciar se o que está ocorrendo é hiperalgesia ou alodinia. Estes pesquisadores relatam que há similaridades e diferenças qualitativas entre camundongos e ratos em termos de liberação de citocinas por um estímulo inflamatório e seus mecanismos de ação hipernociceptivos. Esses pesquisadores relataram que tanto em ratos quanto em camundongos ocorre à liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e do Quimioatraente para Neutrófilos Induzidos por Citocinas 1/Quimiocina Derivado de Queratinócito (CINC-1/QQ), esses últimos são homólogos da IL-8 humana. Estas citocinas iniciam duas vias básicas de hipernocicepção mecânica inflamatória. Uma via dependente de prostaglandina e outra que não depende de prostaglandina, a simpática, que depende da liberação de aminas simpatomiméticas, como a dopamina (DA) (CUNHA *et al.*, 1991; CUNHA *et al.*, 2005).

Nas duas espécies a liberação de prostanóides é estimulada por IL-1 $\beta$ . Porém, o TNF- $\alpha$  estimula as duas vias em ratos e somente a via das PGs em camundongos. O CINC-1, por sua vez, estimula somente o componente simpático em ratos, enquanto KC estimula ambas as vias hipernociceptivas em camundongos (CUNHA *et al.*, 1992; LORENZETTI *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2005).

Outra diferença entre ratos e camundongos está na participação do sistema das cininas em iniciar a cascata de citocinas na hipernocicepção mecânica. Na hipernocicepção induzida por carragenina (Cg) em ratos, há um evento recente de ativação do sistema cininas plasmáticas com conseqüente produção de BK que por sua vez, induz a produção de TNF- $\alpha$ , através da ativação de receptores B1 e B2. Em contraste, em camundongos, a hipernocicepção inflamatória mediada pela BK, não depende de citocinas. A BK ativa diretamente a liberação de PGs e aminas simpatomiméticas (CUNHA *et al.*, 2005).

Quando o estímulo através da Cg é dado, em camundongos, ocorre a ativação das duas vias de citocinas, tanto a via do TNF- $\alpha$  quanto e a via da KC. Ambas atuam na liberação de IL-1 $\beta$  e prostanóides. No entanto, KC atua adicionalmente por meio das aminas simpatomiméticas, como a DA. Além disso, TNF- $\alpha$  pode atuar diretamente na sensibilização dos nociceptores (CUNHA *et al.*, 2005). Para melhor entender essa cascata segue a Figura 01, que apresenta um diagrama modificado desta cascata proposta por Cunha e colaboradores em camundongos (CUNHA *et al.*, 2005)

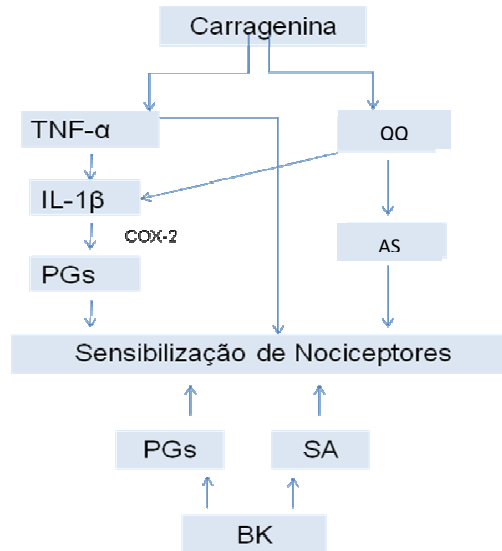


FIGURA 1: SEQUÊNCIA DE LIBERAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS INICIADOS PELA CARRAGENINA (CUNHA *et al.*, 2005) (TNF-  $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta; PGs: Prostaglandinas; COX-2: Ciclooxygenase 2; AS: Aminas Simpatomiméticas; BK: Bradicinina).

#### 1.4 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

Apesar da inflamação e da dor serem respostas de defesa do organismo, visando proteger o mesmo, os pacientes passam por sensações desagradáveis e também muitas vezes essas sensações estão ligadas ao sofrimento em várias patologias, particularmente em doenças inflamatórias crônicas. Por esse motivo o uso de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos é muito frequente na grande maioria dos pacientes.

Existem variadas classes de substâncias que podem ser utilizadas como anti-inflamatórias e analgésicas. Dentre essas, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) constitui a principal classe dos fármacos utilizados. E nesta classe tem-se o ácido acetilsalicílico, que é uma das drogas mais utilizadas no mundo todo. Os AINEs são muito utilizados devidos aos seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos. Esses efeitos se devem à inibição da ciclooxygenase (COX), inibindo assim, a produção de endoperóxidos cíclicos e consequentemente PGs tanto periféricamente quanto no SNC. Esse mecanismo de ação foi descrito pela primeira

vez em 1971 pelo pesquisador John R. Vane. Os AINEs são utilizados para o tratamento de diversas doenças que estão relacionadas a condições inflamatórias, tais como osteoartrite, artrite reumatóide, artrite psoriática, artrite relacionada à doença intestinal inflamatória, algumas síndromes musculoesqueléticas localizadas como entorses e distensões e são empregados para o alívio da dor pós operatória e dental, por exemplo (VANE, 1971; BARNES e ADCOCK, 1993; DANNHARDT e KIEFER, 2001; MARNETT, 2009).

Dentre as isoformas da COX, a primeira a ser isolada e caracterizada foi a isoforma COX-1. Essa isoforma está presente nas células em condições fisiológicas normais, ou seja, ela é expressa constitutivamente. Sua concentração permanece praticamente estável nos tecidos. Já a isoforma COX-2 pode ser constitutiva no SNC e no rim, porém, sua concentração pode ser induzida em células expostas a agentes pró-inflamatórios, tais como citocinas (VANE e BOTTING, 1995; PAIRET e ENGELHARDT, 1996). Portanto as concentrações da COX-2 aumentam bastante durante um processo inflamatório, e essa descoberta possibilitou a busca de fármacos que fossem seletivos para inibir somente essa isoforma para tratar a inflamação (VANE e BOTTING, 1996; DANNHARDT e KIEFER, 2001). Outra isoforma da COX é a COX-3, ela foi descoberta mais recentemente e sugere-se que ela também apresenta um papel na produção de PGs (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002; BOTTING, 2003).

As isoformas da COX atuam sobre os ácidos graxos essenciais e sintetizam as PGs. Estas PGs por sua vez são importantes mediadores da resposta inflamatória e da nocicepção. Elas vão atuar sensibilizando os neurônios da dor e essa sensibilização é resultado de uma diminuição do limiar dos nociceptores tornando-os assim responsivos a intensidades de estímulos menores. Com relação ao edema, as PGs produzidas principalmente via COX-2 promovem vasodilatação, aumentando o aporte sanguíneo à área inflamada e, portanto potenciando o edema. Na febre, as prostaglandinas geradas no hipotálamo produzem a alteração do termostato hipotalâmico (DINARELLO *et al.*, 1991; O'NEILL e FORD-HUTCHINSON, 1993; O'BANION, 1999). Portanto a inibição da COX resulta em efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos (DANNHARDT e KIEFER, 2001; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). Existem dentro dessa classe de AINEs os que são não seletivos, como a aspirina, o diclofenaco, a indometacina entre muitos



outros. Um dos maiores problemas do uso desses medicamentos é o efeito que eles causam no trato gastrointestinal, pois as PGs de uma forma geral exercem uma função protetora sobre a mucosa gástrica diminuindo a secreção de ácido e aumentando a secreção de muco e bicarbonato. Alguns dos outros efeitos colaterais que esses medicamentos causam são hipersensibilidade, alteração no tempo de coagulação, alteração na função renal entre outros (MARKIEWICZ e PASENKIEWICZ-GIERULA, 2011).

Uma vez que a isoforma COX-2 tem sua síntese aumentada frente a um estímulo inflamatório, houve uma busca por fármacos que fossem seletivos para essa isoforma. E dentro dessa classe temos os denominados coxibes. Mesmo que os fármacos seletivos para a COX-2 possuam uma segurança melhor para o trato gastrointestinal, alguns membros dessa classe apresentaram um risco muito grande em efeitos colaterais sobre o sistema cardiovascular. E por esse motivo, algumas substâncias já foram retiradas do mercado. Alguns dos fármacos dessa classe são: celecoxibe, parecoxibe, rofecoxibe, etoricoxibe entre outros (VANE e BOTTING, 1995; PAIRET e ENGELHARDT, 1996; VANE e BOTTING, 1996).

Outra classe de substâncias utilizada para o tratamento da inflamação são os glicocorticóides, corticóides ou corticosteróides. Além de seu uso no tratamento de da inflamação eles também são utilizados no tratamento de alergias, alguns distúrbios hematológicos entre outros. Essas substâncias são anti-inflamatórias e imunossupressoras potentes, eficazes e amplamente utilizadas tanto em processos agudos quanto crônicos (PERRETTI e AHLUWALIA, 2000). Os glicocorticóides agem, em sua grande maioria, através da interação com os receptores de glicocorticóides (GR). Esses receptores estão amplamente distribuídos e pertencem à grande família dos receptores intracelulares. Alguns estudos sugerem que os GRs agem na inflamação através de três mecanismos: efeitos genômicos diretos e indiretos e não genômicos. Os GRs podem interagir com regiões promotoras de genes alvos e regularem a sua transcrição ou interagir com receptores que estão presentes na membrana celular e segundos mensageiros. Os glicocorticóides também podem interferir na expressão de COX-2 e na transcrição gênica de citocinas, bem como de seus receptores, das proteínas quimiotáticas, moléculas de adesão, quimiocinas entre outros mediadores envolvidos na resposta inflamatória. A eficácia dessas substâncias resulta dos efeitos pleiotrópicos dos GRs. Todavia,

esses efeitos causam uma série de problemas tais como hipertensão, inibição da cicatrização, retardo do crescimento em crianças, distúrbios metabólicos e osteoporose. E devido a essa lista de efeitos adversos, o uso prolongado dos corticosteróides é muito limitado (DE BOSSCHER *et al.*, 2003; RHEN e CIDLOWSKI, 2005).

Com relação às drogas analgésicas mais especificamente, outra classe utilizada é a dos opióides. Essa classe possui uma potente ação analgésica através de uma ação tanto central como periférica, entretanto eles podem produzir sedação, constipação, náusea, vômito, depressão respiratória, com tendência a produzir dependência e tolerância. Eles agem através da ativação de mecanismos inibitórios descendentes, inibindo diretamente os terminais nociceptivos ou inibindo as sinapses nociceptivas espinhais. Atualmente a administração sistêmica de opióides é muito efetiva para tratar dores severas como dor aguda, inflamatória e neuropática (AKBARI, 2011; LUTTOSCH e BAERWALD, 2011; POWER, 2011).

Devido a patologias que não respondem adequadamente às drogas convencionais e também devido aos efeitos colaterais das drogas que já estão no mercado, existe uma busca constante de novas drogas que possuam uma eficácia melhor e/ou menos efeitos colaterais. E dentro desse campo de pesquisas a busca por produtos naturais é uma área muito promissora. E dentro dessa área altamente promissora, a pesquisa de plantas medicinais é um campo que está cada vez mais sendo estudado.

### 1.5 PLANTAS MEDICINAIS – *Sinningia allagophylla*

O uso de plantas para o tratamento de problemas de saúde tem sido documentado em todas as sociedades humanas, sendo uma herança cultural de cada povo. O desenvolvimento da medicina moderna no início do século XX relegou esse conhecimento a um segundo plano durante algum tempo. Mas nas últimas décadas tem havido um renovado interesse nas plantas medicinais. A comprovação científica de várias preparações fitoterápicas, bem como o seu baixo custo em relação aos medicamentos industriais tem levado a introdução do uso de plantas medicinais nos sistemas públicos de saúde (STEFANELLO, 2003).

No entanto, a procura de novas substâncias bioativas guiada por informações etnobotânicas apresenta algumas restrições. Em primeiro lugar a possibilidade de se obter informações adicionais sobre plantas medicinais das populações indígenas ou de grupos étnicos isolados torna-se progressivamente mais difícil. Outra complicação percebe-se consultando a literatura. É desconcertante o número de aplicações diferentes encontradas para um grupo de plantas relacionadas e algumas vezes até mesmo para uma única espécie vegetal. E mesmo assim, é astronômico o número de espécies que permanece intocado, e que potencialmente contém substâncias com propriedades farmacológicas (GOTTLIEB, 1982). É necessário ainda reconhecer que é pouco provável que famílias ou gêneros muito estudados possam fornecer substâncias realmente novas ou com atividade farmacológica diferenciada (STEFANELLO, 2003). Por essas razões a pesquisa de substâncias úteis precisa direcionar-se para aquelas famílias pouco estudadas, mas quimicamente promissoras, mesmo que suas espécies não sejam muito usadas na medicina popular.

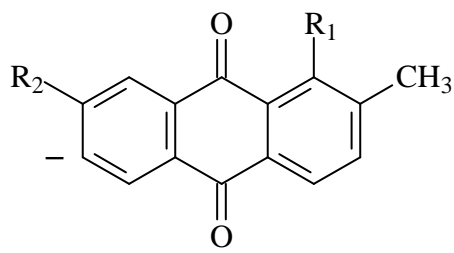
O uso de produtos naturais é um caminho muito promissor na descoberta de novos fármacos. A natureza de uma forma geral tem produzido a grande maioria das substâncias orgânicas conhecidas e o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para esse fornecimento (PHILLIPSON e ANDERSON, 1989; FERRIS, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003). A grande diversidade química das plantas faz delas uma importante fonte para o isolamento de metabólitos farmacologicamente relevantes. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), principalmente em países subdesenvolvidos, devido a pobreza e a falta de acesso a medicamentos industrializados, cerca de 80% da população faz uso de plantas medicinais no combate primário às doenças (CALIXTO, 2000; BASSO *et al.*, 2005). As plantas medicinais desempenham, portanto, papel muito importante na medicina moderna. Primeiramente porque podem fornecer fármacos extremamente importantes. Em segundo lugar, as fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. E em terceiro lugar, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (TUROLA, 2006).

A família Gesneriaceae compreende 135 gêneros e cerca de 3000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. As espécies do Novo Mundo diferem significativamente daquelas do Velho Mundo, de modo que a família é comumente dividida em duas subfamílias: Cyrtrandoideae, quase inteiramente confinada ao Velho Mundo, e Gesnerioideae, confinada a América tropical. No Brasil a família é estimada em 23 gêneros e 200 espécies (ARAUJO *et al.*, 2005).

O gênero *Sinningia* compreende atualmente 68 espécies, das quais cerca de 60 ocorrem em território brasileiro. O centro de diversidade do gênero é a região sudeste do Brasil, onde é encontrada a maioria das espécies. As espécies de *Sinningia* são ervas ou subarbustos, de ciclo anual, com tubérculo perene. Crescem durante a primavera, florescem e entram em declínio durante o outono/inverno, quando perdem as suas partes aéreas. As gemas dormentes permanecem nos tubérculos, ocorrendo o brotamento quando as condições se tornam favoráveis (primavera/verão). Todas as espécies de *Sinningia* produzem belas flores, tendo um grande potencial ornamental. Uma das mais cultivadas é a *S. speciosa*, comercializada com o nome de “gloxinia”. As características fenológicas deste gênero aliada a uma coleta indiscriminada tem colocado algumas espécies em risco de extinção (ARAUJO *et al.*, 2005; UNEMOTO, 2006; CHAUTEMS *et al.*, 2010).

A química da família Gesneriaceae em geral, e do gênero *Sinningia* em particular, é pouco conhecida. É possível que o amplo uso das gesneriáceas como plantas ornamentais, aliado aos poucos relatos de uso medicinal tenham desestimulado as pesquisas em fitoquímica. O fato é que os primeiros estudos químicos foram voltados para a identificação de substâncias que pudessem servir como marcadores químicos, auxiliando na classificação botânica. Assim, *espécimens* cultivadas ou de herbário, foram examinados quanto à ocorrência de flavonóides ou de compostos fenólicos (KVIST e PEDERSEN, 1986). Posteriormente surgiram trabalhos voltados para o isolamento e determinação estrutural dos metabólitos secundários. Estes estudos, realizados com espécies do Velho Mundo mostraram que em Gesneriaceae ocorrem principalmente compostos fenólicos glicosilados, além de flavonóides, xantonas, quinonas, triterpenos e diterpenos (GUHA e BHATTACHARYYA, 1992; DAMTOFT e JENSEN, 1994; YANG *et al.*, 1998; ZAITLIN e PIERCE, 2010).

Em relação ao gênero *Sinningia* poucas espécies tiveram algum tipo de estudo químico. O aroma das flores de *Sinningia tubiflora* contém linalol como principal constituinte, juntamente com vários compostos alifáticos (PERRET *et al.*, 2003). Antocianinas foram isoladas das flores de *Sinningia cardinalis* (SWINNY *et al.*, 2000). O óleo essencial das partes aéreas de *Sinningia aggregata* contém sesquiterpenos e compostos alifáticos de cadeia longa (STEFANELLO *et al.*, 2005). Antraquinonas e etilcicloexanos foram relatados em *Sinningia speciosa* (VERDAN *et al.*, 2009). Recentemente, três novas lactonas aromáticas, uma nova naftoquinona e três antraquinonas conhecidas, foram relatadas em *Sinningia speciosa* (VERDAN *et al.*, 2010). A Figura 2 mostra algumas das substâncias que foram isoladas da *Sinningia ssp.*

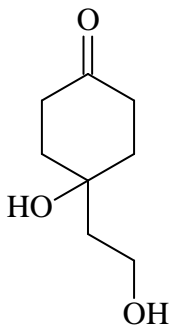


$R_1 = R_2 = H$  – tectoquinona – *S. aggregata*

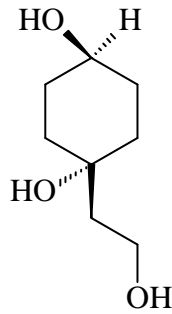
$R_1 = H$ ;  $R_2 = OCH_3$  – 2-metil-7-metoxiantraquinona  
*S. aggregata* e *S. speciosa*

$R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$  – 2-metil-7-hidroxiciantraquinona –  
*S. aggregata*

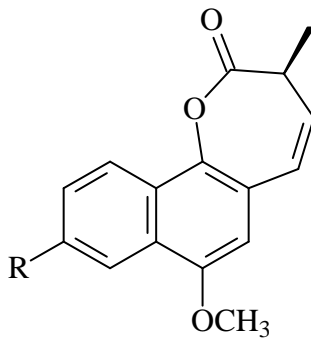
$R_1 = OH$ ;  $R_2 = OCH_3$  – rubiawallin B – *S. speciosa*



cleroindicin B  
*S. speciosa*



isorengiol  
*S. speciosa*

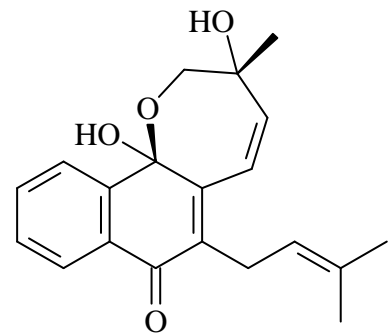


$R = OH$  – aggregatina A

$R = H$  – aggregatina B

$R = OCH_3$  – aggregatina C

*S. aggregata*



aggregatina D

*S. aggregata*

FIGURA 2: ALGUMAS DAS SUBSTÂNCIAS QUE FORAM ISOLADAS DA *Sinningia* *ssp.*

Apesar de ser uma família pouco usada na medicina popular, a diversidade química e a ocorrência de classes de compostos com atividade biológica tornam as espécies de Gesneriaceae muito promissoras para o isolamento de substâncias novas e com atividade biológica. No estado do Paraná são encontradas mais de uma dezena de espécies de *Sinningia* (dados do Herbário da UFPR). Entre estas se destacam *S. allagophylla* e *S. douglasii*.

A *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler é uma espécie arbustiva, que atinge até 1 m de altura, largamente distribuída. É encontrada no Brasil desde Goiás até o Rio Grande do Sul, além do Paraguai e Argentina. Distingue-se pela intensa coloração (rosa, vermelho ou alaranjado) das inflorescências e das hastes que as suportam, podendo esta coloração chegar até as partes vegetativas. Recebe os nomes populares de cravo-da-campo, batatinha-do-campo ou batata-de-perdiz, sendo a única espécie do gênero considerada medicinal. Os tubérculos são empregados como tônico e emoliente, enquanto que as flores e folhas são utilizadas como febrífugo, depurativo e diurético (MORS *et al.*, 2000; ARAUJO *et al.*, 2005; CHAUTEMS *et al.*, 2010). Ensaio farmacológico preliminares realizados em nosso laboratório demonstraram que o extrato etanólico dos tubérculos possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (MORI, 2008). A Figura 3 mostra algumas fotos da *Sinningia allagophylla*.



FIGURA 3: FLORES *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico, das frações e do composto 8-metoxilapachenol isolados dos tubérculos obtidos de *Sinningia allagophylla*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito anti-inflamatório (antiedematogênico) do extrato etanólico da *Sinningia allagophylla* (EESAI), das frações e do composto 8-metoxilapachenol (8ML) administrado por via oral no modelo de edema de pata induzido por Cg em camundongos.
2. Avaliar o efeito antinociceptivo do EESAI administrado por via oral no modelo de nocicepção química induzido por formalina em camundongos.
3. Avaliar o efeito antihiperálgico do EESAI, das frações e do composto 8ML administrado por via oral no modelo de hiperálgia mecânica induzida pela Cg em camundongos através.
4. Avaliar o efeito antinociceptivo do EESAI e do composto 8ML administrado por via oral no modelo de nocicepção térmica (modelo da placa quente) em camundongos.
5. Avaliar o efeito do EESAI e do composto 8ML administrado por via oral sobre o desempenho motor (modelo rota-rod) em camundongos.
6. Avaliar o efeito do composto 8ML administrado no local sobre a hiperálgia mecânica induzida pela Cg em camundongos.
7. Avaliar o(s) possível(is) mecanismo(s) envolvido(s) no efeito antinociceptivo do composto 8ML através da administração local de mediadores inflamatórios como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Dopamina (DA) e CINC-1.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos (25-35 g) proveniente do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em salas de aclimação do Laboratório de Inflamação, Dor e Febre do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, em temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade controlada (60-80%), ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 07:00) e com livre acesso a água e ração. Os animais foram retirados da sala de aclimação e mantidos no laboratório de experimentação para adaptação por um período de pelo menos 1 h antes do início dos experimentos e foram utilizados somente uma vez em cada teste. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pelo Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (Certificado nº 387). Além disso, o presente estudo foi realizado em conformidade com as diretrizes atuais para os cuidados com os animais de laboratório e orientações éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes de acordo com (ZIMMERMANN, 1983), seguindo as orientações do Instituto Nacional de Saúde (E.U.A.).

#### 3.2 MATERIAL BOTÂNICO, PREPARAÇÃO DO EXTRATO, FRACIONAMENTO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO ATIVO

Foram coletados tubérculos de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler, em Palmeira, PR. A planta foi identificada pela bióloga Clarisse Bolfe Poliquesi, do Museu Botânico Municipal de Curitiba e uma exsicata (31.3530) foi depositada no herbário daquela instituição. O material vegetal foi secado em estufa a 40°C e moído.

A preparação do extrato, das diferentes frações e o isolamento e identificação dos compostos foram realizadas pelo grupo da Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Resumidamente, o material botânico seco e moído (tubérculos 46,9 g) foi extraído à

temperatura ambiente com etanol. O solvente, 50 mL para cada 10 g de material, foi deixado em contato com o material por 24 h, e então renovado. Foram realizadas três extrações sucessivas. As soluções obtidas foram reunidas e o solvente foi removido em evaporador rotativo, rendendo 5,84 g de extrato (12,45%). Parte do extrato em etanol (1,0 g) foi dissolvida em etanol: água 1:1 e submetida à partição com hexano, diclorometano, acetato de etila e 1-butanol, rendendo as frações sall-1 (4,5%), sall-2 (19,3%), sall-3 (10,3%) e sall-4 (27,6%). A figura 4 mostra o esquema dessa partição e fracionamento.

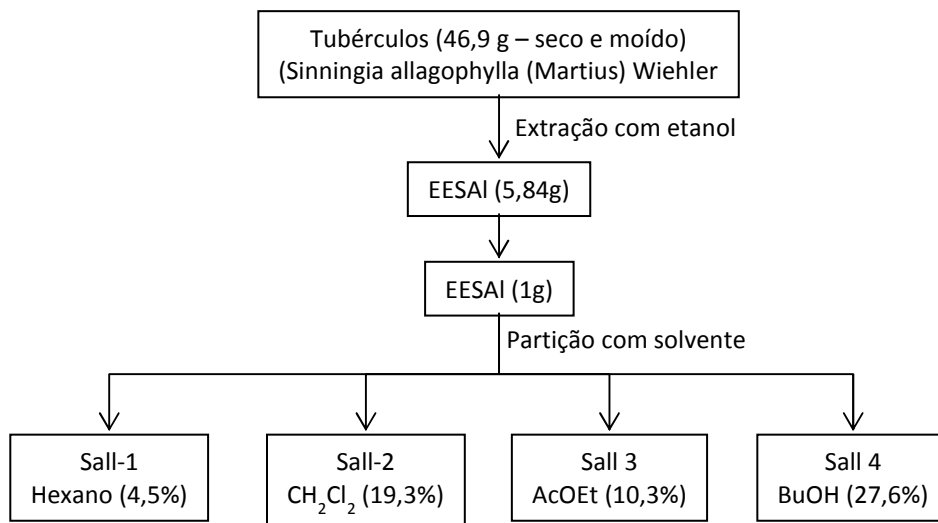


FIGURA 4: EXTRAÇÃO, PARTIÇÃO E FRACIONAMENTO DOS TUBÉRCULOS de *Sinningia allagophylla*

Porém, nos ensaios biológicos essas frações não apresentaram um bom resultado, como será explicado mais adiante. Assim foi feito um novo fracionamento. Outra amostra (1,0 g) desse extrato bruto foi dissolvida em MeOH-H<sub>2</sub>O 9:1 e particionado apenas com éter de petróleo, rendendo 2 frações, a fração Eter de Petróleo (EP) com rendimento de 5% e a fração metanólica (MeOH) com rendimento de 95%. A Figura 5 mostra o novo fracionamento do EESAI.

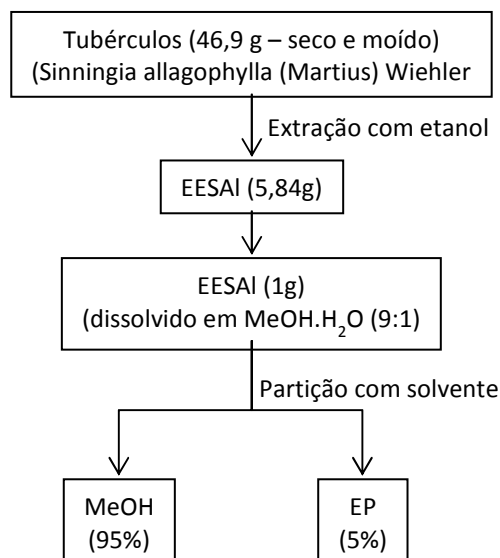


FIGURA 5: NOVA PARTIÇÃO E FRACIONAMENTO DOS TUBÉRCULOS de *Sinningia allagophylla*

O fracionamento cromatográfico da fração hexânica, proveniente do extrato etanólico de tubérculos de *S. allagophylla*, resultou no isolamento e identificação de 10 substâncias até o momento as quais foram identificadas através de análise de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de Hidrogênio  $^1\text{H}$ , RMN de Carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ), DEPT, HSQC, HMBC, espectros de massas e comparação com dados da literatura.

A substância SAL-1 foi isolada como um óleo amarelo. A análise cuidadosa dos espectros HSQC e HMBC permitiu deduzir a estrutura apresentada na figura 6. Uma pesquisa na literatura (*Sci-Finder*) mostrou que esse composto é uma substância conhecida como lapachenollapachenol, já isolada de espécies das famílias Rubiaceae, Bigoniaceae e Verbenaceae (GONZALES *et al.*, 1976; DOMINGUEZ *et al.*, 1989; REIBENSPIES *et al.*, 1989; SCHMEDA-HISCHMANN e PAPASTERGIU, 2003).

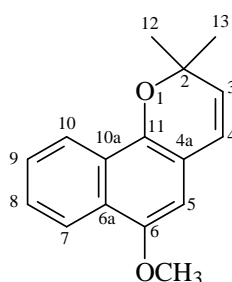


FIGURA 6: ESTRUTURA DO COMPOSTO LAPACHENOL

A substância SAL-2 foi isolada como um sólido amarelo. O seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 8) foi muito semelhante ao da substância SAL-1. A principal diferença foi a presença de dois sinais de grupos metoxila e de três hidrogênios aromáticos, com padrão de acoplamento característico de um anel 1,2,4-trissubstituído. Esses dados sugeriram um derivado do lapachenol, com substituição na posição 8. A estrutura proposta (figura 7) foi confirmada pelos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC. Este composto é inédito na literatura e foi denominado 8-metoxilapachenol (8ML).

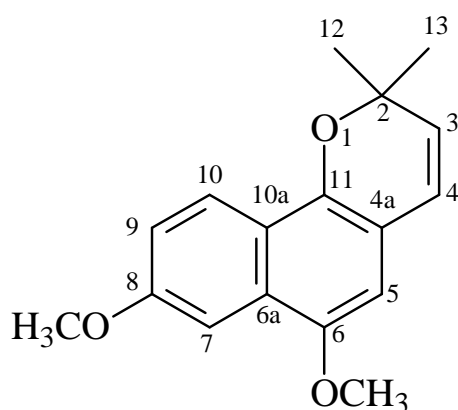


FIGURA 7: ESTRUTURA DO COMPOSTO 8-METOXILAPACHENOL

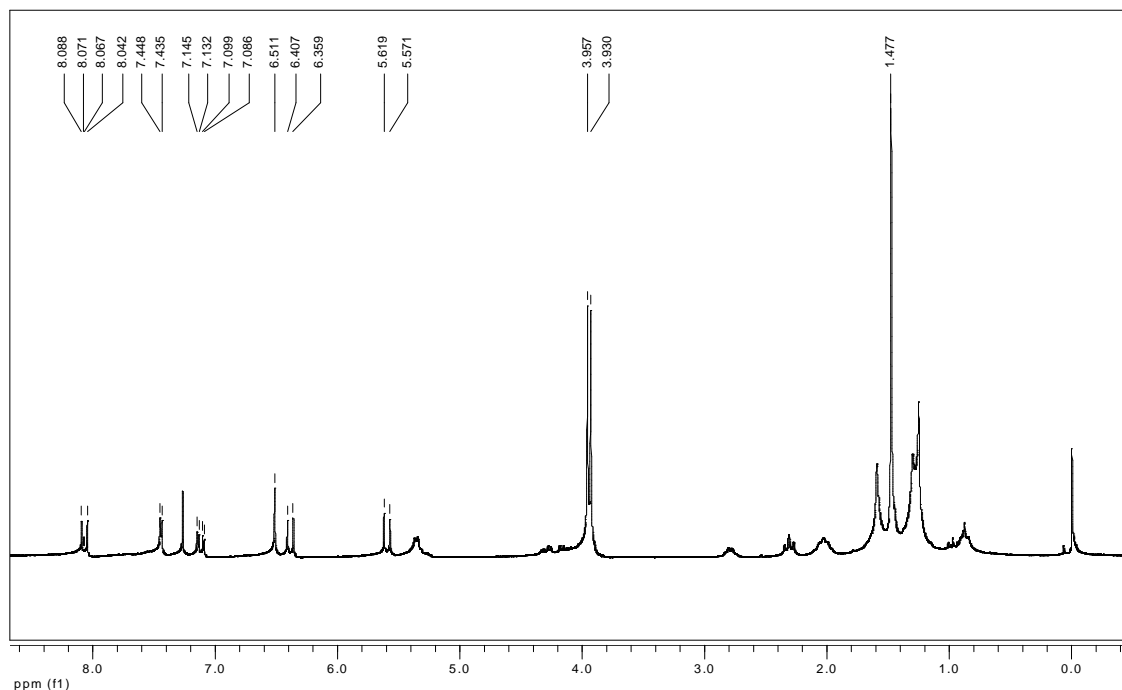


FIGURA 8: ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO 8ML ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

### 3.3 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato bruto, frações e composto isolado foi utilizado o modelo de edema de pata em camundongos conforme descrito anteriormente (KASSUYA *et al.*, 2009). Para tanto, os animais foram tratados por via oral (v.o.) com EESAI (nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg), ou com as frações MeOH (30mg/kg) ou EP (3mg/kg) ou com o composto 8ML (1,8mg/kg). Animais controle receberam o mesmo volume de veículo (Tween 80 0,1 % v/v), ou dexametasona (1mg/kg), usada como controle positivo. As doses das frações e do composto em todos os modelos experimentais foram calculadas com base na dose do EESAI de 30mg/kg levando-se em conta os respectivos rendimentos. Após 1 h, os animais receberam uma injeção intraplantar (i.pl.) de Cg (300µg/pata) em um volume de 20 µL na pata direita. Na pata esquerda foi injetado 20 µL de salina. O aumento de espessura da pata foi medido com o auxílio de um micrômetro digital em diferentes tempos após o estímulo inflamatório (0,5, 1, 2 e 4 h). A diferença ( $\Delta$ ) entre as espessuras da pata direita e esquerda foi quantificada em µm e tomada como índice de edema.

### 3.4 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA

Dentre os modelos utilizados para a avaliação da atividade analgésica do extrato utilizou-se a nocicepção induzida por formalina. O procedimento foi realizado conforme descrito por (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Resumidamente, os animais foram colocados individualmente em plataformas de observação transparentes, sob funil de vidro invertido com espelho ao fundo, por um período de adaptação de no mínimo 20 min. Após esse período, os animais receberam por v.o. o EESAI (3; 10 e 30 mg/kg), ou veículo (Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg), ou indometacina (5mg/kg), utilizada como controle positivo. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção i.pl. de 20 µL de solução de formalina 2,5 % v/v (0,92 % de formaldeído) na pata posterior direita. Logo após a injeção da formalina, os animais foram colocados novamente nas plataformas de observação. O comportamento nociceptivo avaliado foi o tempo em que o animal permaneceu lambendo, mordendo ou elevando a pata injetada com formalina. Este comportamento nociceptivo foi observado durante 40

min, cronometrados de 5 em 5 min. Este comportamento durante este período de observação é considerado indicativo de nocicepção que manifesta-se em 2 fases: a primeira fase (Fase I), que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção de formalina, caracterizada pelo estímulo direto da formalina no nociceptor, também conhecida como fase neurogênica, e a segunda fase (Fase II), que ocorre entre 15 e 40 min após a formalina, que representa a fase inflamatória.

### 3.5 HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Outro modelo utilizado para avaliação da atividade analgésica do EESAI, das frações e do composto isolado foi o modelo de hiperalgesia mecânica induzida por Cg. Os procedimentos foram executados conforme descrito anteriormente (MORI *et al.*, 2011). Neste modelo, é necessária a determinação do limiar mecânico basal, que é realizado no dia anterior a realização do experimento, a fim de estabelecer o limiar de sensibilidade mecânica dos animais sem nenhum tratamento.

A avaliação do limiar de sensibilidade mecânica foi realizada pelo método de *up and down* (CHAPLAN *et al.*, 1994), utilizando filamentos de von Frey. De maneira sucinta, os camundongos foram colocados em caixas com uma das faces transparente sobre uma plataforma com fundo de tela de arame, possibilitando o acesso dos filamentos de von Frey à pata traseira do animal. Após a adaptação ao clima dos animais (em torno de 2 a 3h), foram utilizadas uma série de filamentos de 0,008 a 6,0 g aplicados em ordem crescente ou decrescente para determinar 50% do limiar de retirada da pata (limiar 50%) (DIXON, 1980). O primeiro filamento da série testado foi sempre o de 0,4 g na pata posterior direita. Foram realizadas 6 avaliações com intervalos de 10 s. A ausência de resposta com um determinado filamento levou à utilização de outro filamento de maior massa e assim sucessivamente. Havendo retirada ou lambida da pata pelo animal, um filamento de menor massa foi aplicado após um intervalo de 2 min. O limiar de retirada da pata (50% do limiar) foi calculado de acordo com (DIXON, 1980), representada pela seguinte equação:

$$\text{Limiar } 50\% = 10^{\left[\log \text{ do último filamento } \pm (\text{valor da tabela (Dixon, 1980)} \times 0,4)\right]}$$

No dia do experimento, os animais foram tratados por v.o. com EESAI (3, 30 e 300 mg/kg), fração EP (3mg/kg) ou o composto 8ML (1,8mg/kg) ou veículo (Tween

80 0,1 % v/v) (10 mL/kg), 1 h antes da injeção i.pl de 20 µL (pata posterior direita) de Cg (300 µg/pata). O limiar mecânico foi avaliado novamente, conforme descrito acima, 3h após a injeção de Cg.

Em outra série de experimentos, para avaliar se o composto era capaz de promover um efeito analgésico quando administrado no local, a limiar basal foi avaliado no dia anterior ao experimento. No dia seguinte os animais receberam uma injeção local do composto 8ML (0,75, 7,5, 75 ou 750 pg/pata) ou veículo (salina) em um volume de 20 µL, 15 min antes da injeção i.pl de 20 µL (pata posterior direita) de Cg (300 µg/pata) e o limiar foi novamente avaliado após 3h. Para confirmar este efeito local, grupos distintos de camundongos receberam na pata ipsilateral (pata posterior direita) ou na pata contralateral (pata posterior esquerda) o composto 8ML (750 ng/pata) em um volume final de 20 µL. Quinze minutos após o tratamento, os animais receberam, somente na pata ipsilateral, Cg (300 µg/pata) em um volume final de 20 µL. Neste protocolo utilizamos somente o composto isolado, pois a mistura de compostos presentes no extrato bruto poderia causar danos aos tecidos. É importante salientar que o limiar mecânico sempre foi medido na pata direita, ou seja, na pata que recebeu Cg.

Para o estudo do(s) possível(is) mecanismo(s) envolvido(s) no efeito antinociceptivo do composto 8ML, foi administrado 750ng/pata do composto na pata direita, em um volume final de 20 µL, e 15 min após o tratamento a hiperalgesia foi induzida por TNF- $\alpha$  (1 pg/pata), IL-1 $\beta$  (0,5 pg/pata); PGE2 (100 ng/pata); DA (10 µg/pata); CINC-1 (100 pg/pata) (CUNHA *et al.*, 2008). A avaliação da hiperalgesia foi realizada 3 h após a administração dos agentes nociceptivos utilizando o método descrito anteriormente.

### 3.6 TESTE DA PLACA QUENTE

O teste da placa quente foi utilizado para avaliar o efeito do EESAI e do composto 8ML sobre a nocicepção térmica de acordo com o método descrito anteriormente (EDDY e LEIMBACH, 1953), com algumas modificações. Neste experimento, o aparelho de placa quente foi mantido a  $54 \pm 1^\circ\text{C}$ . Grupos de camundongos foram tratados v.o. com EESAI (300 mg/kg v.o.), 8ML (1,8 mg/kg, v.o.) ou fentanil (100 µg/Kg s.c.) como controle positivo e, após 1 hora para o grupo

tratado com EESAI ou 8ML ou 15 min para o fentanil, os animais foram colocados sobre a superfície aquecida. A fuga dos animais foi impedida por um anteparo retangular de vidro para permitir a observação do comportamento nociceptivo. O tempo decorrido entre a colocação do animal e o aparecimento das reações de balançar ou lambe as patas, ou ainda de subir na parede do anteparo foi registrado e considerado como índice de latência. Um tempo máximo de 30 s foi utilizado para prevenir possíveis danos teciduais (tempo de corte). Cada animal foi testado antes da administração das drogas a fim de obter uma resposta basal (latência basal) e foram utilizados somente animais com índice de latência basal inferior ou igual a 15 s. Os dados foram apresentados como percentagem do Máximo de Efeito Possível (% MEP), calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\%MEP = (\text{latência pós-droga} - \text{latência basal} / \text{tempo de corte} - \text{latência basal}) \times 100$$

### 3.7 EFEITO SOBRE O DESEMPENHO MOTOR (ROTA-ROD)

Uma vez que a maioria dos testes nociceptivos dependem do perfeito desempenho motor dos animais (balançar, lambe a pata, etc), a avaliação deste parâmetro é essencial para uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos testes para determinação da atividade antinociceptiva. Portanto, drogas que promovem relaxamento ou sedação, alteram o desempenho motor, sem serem necessariamente antinociceptivas, resultando portanto em falso-positivos. Esse teste foi desenvolvido de acordo com o método de (DUNHAM e MIYA, 1957) e o desempenho motor do animal foi medido no aparelho "rota-rod" (mod. DS 37, Ugo Basille). Foram utilizados três grupos contendo de 8 a 10 camundongos, sendo computado o tempo basal de permanência (em segundos) na barra giratória (velocidade de 22 rpm aproximadamente) de, no máximo, 3 min (tempo de corte). Os grupos foram tratados com EESAI (300 mg/kg; v.o.), ou com 8ML (1,8 mg/kg v.o.) ou com o mesmo volume de veículo (10 mL/kg; v.o.) ou ainda com Diazepam (5 mg/kg; s.c.) usado como controle positivo. Uma hora após a administração do EESAI ou do 8ML ou do veículo ou 15 min após o tratamento com diazepam, os animais foram colocados no aparelho e o tempo de permanência no aparelho foi cronometrado.



### 3.8 DROGAS E REAGENTES

Cg, indometacina, fentanil, diazepam, prostaglandina E<sub>2</sub>, cloridrato de dopamina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO - E.U.A.). IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CINC-1 foram adquiridos da R & D Systems, E.U.A. O restante dos sais e compostos foi adquirido de companhias com comprovada certificação de qualidade e eram de grau analítico.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Bonferroni. Valores de  $P$  menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITO DO EESAI NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

A administração de salina na pata contralateral dos animais não induziu diferenças significativas no volume da pata. A injeção de Cg induziu um aumento na espessura da pata, caracterizando o edema, nos animais tratados somente com veículo, atingindo um pico máximo na segunda hora e permanecendo até a quarta hora. O tratamento dos animais com o EESAI nas doses de 30 e 100 mg/kg inibiram a formação de edema nos primeiros 30 minutos. Já as doses de 10 e 3 mg/kg iniciaram a inibição na primeira e segunda hora, respectivamente (figura 9A). O tratamento dos animais com EESAI (3, 10, 30 e 100mg/kg) induziu uma inibição significativa de  $30\pm 7\%$ ,  $29\pm 7\%$ ,  $56\pm 5\%$  e  $56\pm 8\%$ , respectivamente, 4 h após a administração de Cg. De maneira similar, o tratamento dos animais com Dex, controle positivo, inibiu de forma significativa ( $71\pm 5\%$ ) a formação do edema na quarta hora (figura 9B).

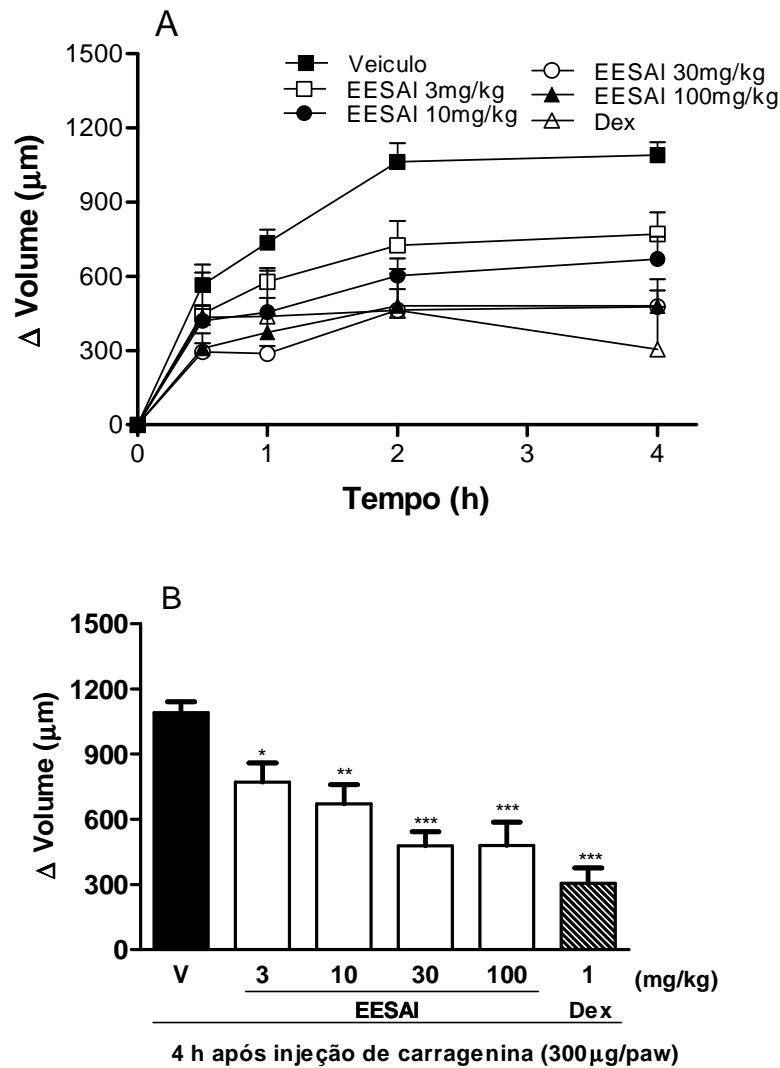


FIGURA 9: EFEITO DO EESAI SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. No painel A os animais foram tratados por via oral com EESAI, nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg ou com veículo (V) (Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg), ou com dexametasona (Dex, 1 mg/kg). Uma hora após o tratamento os animais receberam uma injeção i.pl. de Cg (300 μg/pata) como estímulo inflamatório. No painel B mostra os resultados 4 h após a administração de Cg. Os pontos e as barras representam a média  $\pm$  E.P.M. da espessura (μm) da pata dos animais (n=6) nos diferentes tempos após a injeção de Cg ou na quarta hora após a administração de Cg, respectivamente. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo tratado com veículo (\*  $p < 0,1$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.2 EFEITO DO EESAI NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA

A administração de formalina na pata dos animais induziu uma resposta bifásica como esperado, com a primeira fase nos primeiros 5 min e a segunda fase ocorrendo entre 15 e 40 min. Podemos perceber na Figura 10, que o tratamento dos animais com EESAI não modificou a Fase I da resposta à formalina. Em contraste, o tratamento dos animais com as diferentes doses de EESAI ou com indometacina promoveu uma diminuição significativa na Fase II ou Fase inflamatória. O tratamento dos animais com EESAI nas doses de 3, 10 e 30mg/kg inibiu  $61\pm 5\%$ ,  $63\pm 4\%$ ,  $61\pm 4\%$ , respectivamente, a segunda fase da resposta nociceptiva induzida pela formalina. Já o tratamento com indometacina reduziu  $65\pm 5\%$ .

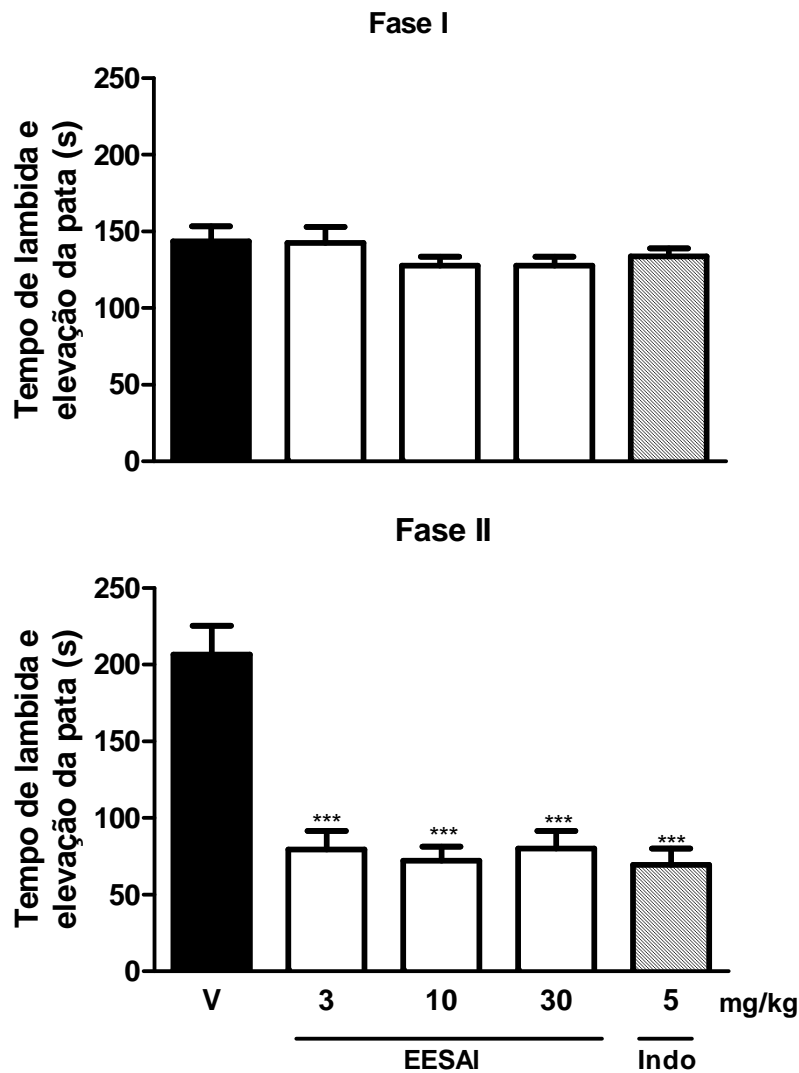


FIGURA 10: EFEITO DO EESAI SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA FORMALINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados v.o com EESAI, nas doses de 3, 10, 30 mg/kg, com veículo (V, Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg), ou com indometacina (Indo), na dose de 5 mg/kg. Uma hora após o tratamento os animais receberam uma injeção i.pl. de uma solução de 2,5% de formalina como estímulo nociceptivo. As barras mostram o tempo que o animal passou executando o comportamento nociceptivo na Fase I (5 min) e Fase II (15-40 min) após a administração da formalina. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. do tempo (s) de elevação ou lambedura da pata dos animais (n=7-9). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo tratado com veículo (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### 4.3 EFEITO DO EESAI NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

Uma vez que o EESAI apresentou efeito sobre a fase inflamatória da resposta à formalina resolvemos avaliar o efeito antinociceptivo deste extrato também no modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina. As medidas basais não foram diferentes entre os grupos e para maior clareza, são apresentadas em conjunto, em uma única coluna na figura. No grupo tratado com veículo o limiar mecânico diminuiu em torno de  $90\pm 2\%$  após a injeção de carragenina (Figura 11). O tratamento dos animais com EESAI na dose de 3 mg/kg não conseguiu reverter a diminuição do limiar mecânico causado pela carragenina, sendo que nesse grupo a diminuição do limiar foi de  $85\pm 1\%$ , quando comparado com o limiar basal. Já o tratamento dos animais com EESAI 30 mg/kg conseguiu reduzir a diminuição do limiar mecânico causada pela carragenina em  $81\pm 8\%$  enquanto que o tratamento dos animais com a maior dose do EESAI (300mg/kg) reverteu completamente a diminuição do limiar mecânico causada pela carragenina (Figura 11).

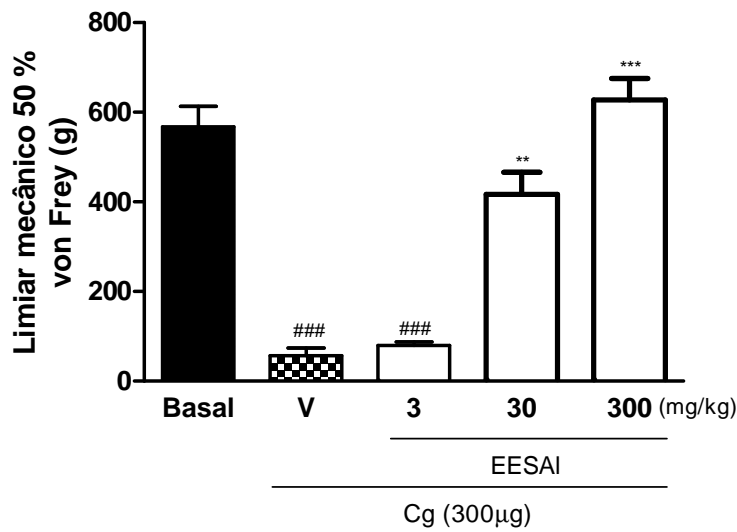


FIGURA 11: EFEITO DO EESAI SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados v.o com EESAI, nas doses de 3, 30, 300 mg/kg ou veículo (V, Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg). Uma hora após o tratamento os animais receberam uma injeção i.pl. de Cg (300 µg/pata) na pata direita. Três horas após a aplicação da Cg, o limiar mecânico 50% foi avaliado utilizando-se os filamentos de Von Frey. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. do limiar mecânico 50% (g) (n=7). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com a basal de todos os animais utilizados (###  $p < 0,001$ ) ou em relação ao grupo tratado com veículo (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.4 EFEITO DAS FRAÇÕES E DO COMPOSTO 8ML SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Para prosseguirmos com a investigação dos efeitos anti-inflamatórios e anti-nociceptivos da *S. allagophyla* iniciamos o fracionamento do EESAI e o efeito anti-inflamatório das frações foi avaliado no modelo de edema de pata induzido pela carragenina. Primeiramente foram preparadas e testadas 4 frações: hexano (sall1), diclorometano (sall2), acetato de etila (sall3) e 1-butanol (sall4), cujo rendimentos foram: sall1 (4,5%), sall2 (19,3%), sall3 (10,3%) e sall4 (27,6%), respectivamente. Levando-se em conta o rendimento de cada fração e baseando-se na dose do EESAI de 30 mg/kg foram calculados as doses e cada fração: sal1 1,5mg/kg, sal2 6mg/kg, sal3 3,0mg/kg e sal4 8,0 mg/kg. Porém, em nenhum dos grupos tratados com as frações obteve-se uma diminuição significativa do edema de pata induzido por Carragenina enquanto que o tratamento com dexametasona, controle positivo, reduziu em 75±4% o edema induzido pela Carragenina na quarta hora (dados não mostrados). Por outro lado, se aumentássemos as doses das frações, todas passavam a ter efeito, sugerindo que o(s) composto(s) ativo(s) havia se distribuído entre as frações. Uma análise preliminar mostrou a presença de 8ML em todas as frações.

Assim, foram feitas duas novas frações, a fração EP (5% de rendimento) e a fração MeOH (95% de rendimento). Levando-se em conta o rendimento de cada fração e baseando-se na dose de 30 mg/kg do EESAI, foram calculadas as doses dessas frações: EP 1,5 mg/kg, e MeOH 30 mg/kg. Devido ao baixo rendimento da fração EP um grupo de animais recebeu o dobro da dose, elevando-se a dose para 3 mg/kg. No grupo tratado com a fração MeOH, o tratamento não foi capaz de reduzir o edema provocado pela carragenina de forma significativa. Porém, os tratamentos com EP (1,5 e 3 mg/kg) reduziram a formação do edema de forma significativa (Figura 12).

Esta fração EP apresentou como composto majoritário o composto 8ML com um rendimento de 60%. Levando-se em conta o rendimento do composto e tendo como base a dose de 3 mg/kg da fração EP, foi calculada a dose do composto 8ML (1,8 mg/kg). O tratamento dos animais com 8ML reduziu de forma significativa o edema de pata induzido por carragenina (Figura 12).



O tratamento dos animais com EP 1,5 mg/kg, EP 3,0 mg/kg, 8ML 1,8 mg/kg e dexametasona 1 mg/kg, na quarta hora reduziu a formação do edema induzido pela carragenina em  $26 \pm 4\%$ ;  $33 \pm 3\%$ ;  $44 \pm 3\%$ ;  $77 \pm 3\%$ , respectivamente (Figura 12). Como somente a fração EP e o composto apresentaram efeito de redução de edema nos experimentos subsequentes somente esta fração e o composto foram utilizados.

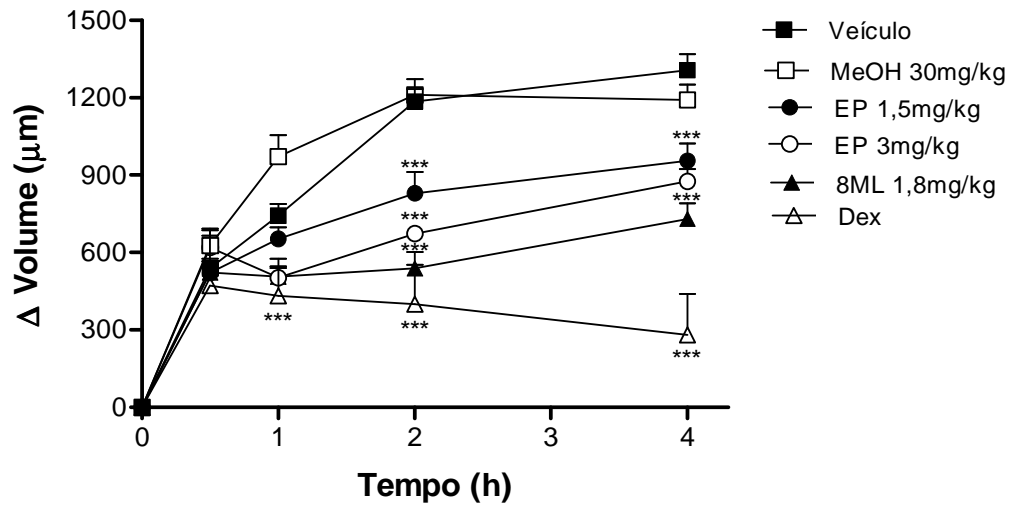


FIGURA 12: EFEITO DAS FRAÇÕES E DO COMPOSTO 8ML SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados v.o com as frações MeOH (30 mg/kg) e EP (1,5 e 3,0mg/kg), com 8ML (1,8 mg/kg) ou com Dex (1 mg/kg). Animais controles receberam veículo (V, Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg). Uma hora após o tratamento os animais receberam uma injeção i.pl. de Cg (300 $\mu$ g/pata) como estímulo inflamatório e a espessura da pata foi avaliada em diferentes tempos após a administração. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M. da espessura ( $\mu$ m) da pata dos animais após a injeção de Cg (n= 6-11). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo tratado com veículo (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 4.5 EFEITO DA FRAÇÃO EP E DO COMPOSTO 8ML NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

O efeito anti-nociceptivo da fração EP e do composto 8ML também foi avaliado no modelo de na hiperalgesia mecânica induzido pela carragenina. No grupo tratado com veículo o limiar mecânico diminuiu em  $75\pm 4\%$  3h após a injeção de carragenina. Porém, o tratamento dos animais com a fração EP ou com o composto 8ML, nas mesmas doses que reduziram o edema, conseguiu reverter completamente, ou seja, em 100%, a diminuição do limiar mecânico causada pela carragenina (Figura 13).

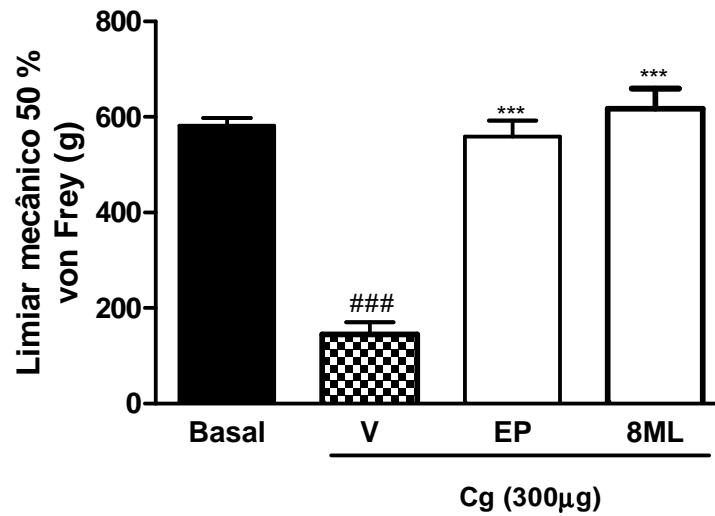


FIGURA 13: EFEITO DA FRAÇÃO EP E DO COMPOSTO 8ML SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados v.o com a fração EP (3 mg/kg), com o composto 8ML (1,8 mg/kg) ou com veículo (V, Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg). Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção i.pl. de carragenina (Cg) (300 µg/pata) na pata direita. Três horas após a aplicação da carragenina, o limiar mecânico 50% foi avaliado utilizando-se filamentos de Von Frey. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. do limiar mecânico 50% (g) (n=6). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com a basal de todos os animais utilizados (###  $p < 0,001$ ) e com o grupo tratado com veículo (\*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.6 EFEITO LOCAL DO COMPOSTO 8ML NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.

O efeito antinociceptivo do composto 8ML também foi avaliado no modelo de na hiperalgesia mecânica induzido pela carragenina após a administração local do composto. No grupo tratado com veículo o limiar mecânico diminuiu em torno de  $71 \pm 2\%$  em relação ao limiar basal (Figura 14A). No grupo que recebeu 0,75 pg/pata do composto 8ML, o tratamento não foi capaz de inibir significativamente a diminuição do limiar mecânico, que permaneceu menor que o limiar basal em  $68 \pm 3\%$ . Porém, o tratamento dos animais com 8ML nas doses de 7,5 e 75 pg/pata reduziu a diminuição do limiar mecânico em  $64 \pm 1\%$  e  $70 \pm 1\%$  respectivamente (Figura 14A). Já o tratamento dos animais com 750 pg/pata de 8ML reverteu completamente à diminuição do limiar mecânico induzida por carragenina (Figura 14A).

A fim de comprovar que o efeito observado tratava-se de um efeito local do 8ML, um outro grupo de animais foi tratado na pata direita ou na pata esquerda com o composto 8ML (750 pg/pata) ou veículo na pata direita. Após 15 min, os três grupos receberam uma injeção i.pl. de carragenina (300  $\mu$ g/pata) na pata direita. Depois de 3 h da aplicação da carragenina, foi medido o limiar mecânico dos animais, sempre na pata direita. No grupo tratado com veículo o limiar mecânico diminuiu em torno de 59% após a administração de carragenina. No grupo que recebeu o tratamento com 8ML na pata direita, ou seja, 8ML e carragenina na mesma pata, o tratamento reverteu completamente a redução do limiar mecânico induzido pela Carragenina. Já o tratamento dos animais com 8ML na pata esquerda e a carragenina na pata direita, não modificou a redução do limiar mecânico causado pela carragenina (Figura 14B).

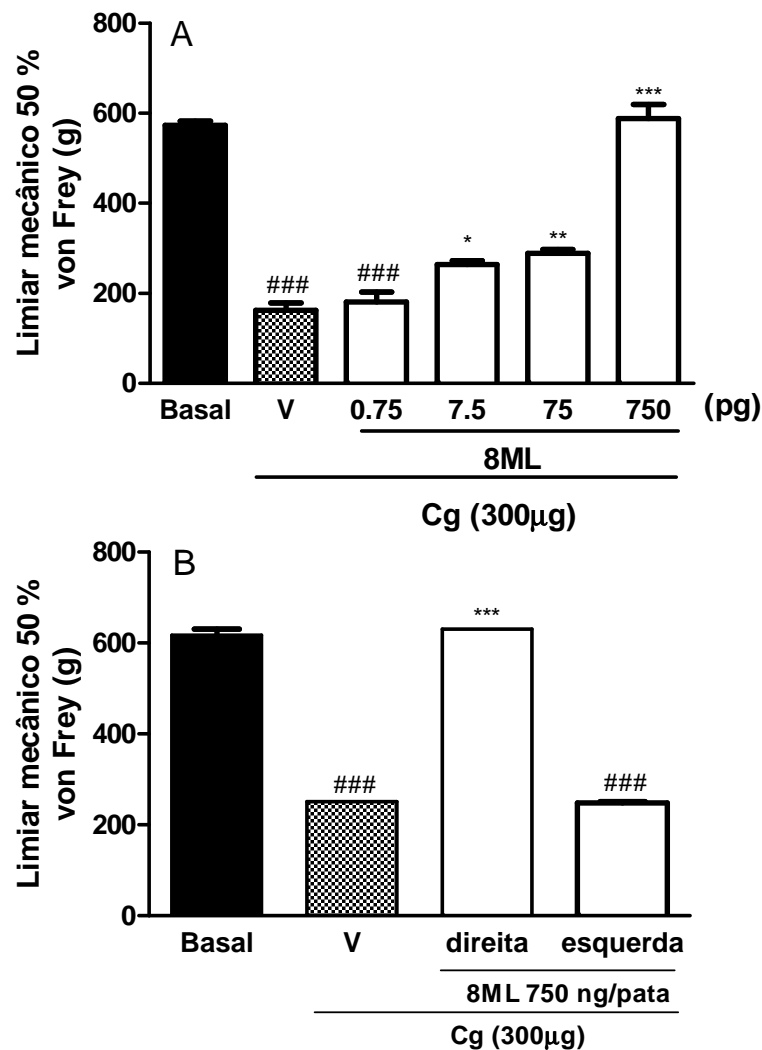


FIGURA 14: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. No painel A os animais foram tratados com diferentes doses do composto 8ML (0,75; 7,5; 75; 750 pg/pata) ou com veículo (V) (Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg). Quinze minutos após o tratamento, os animais receberam uma injeção i.pl. de carragenina (300 µg/pata) na pata direita. O limiar mecânico 50% foi avaliado 3h após a injeção de carragenina utilizando-se filamentos de Von Frey. No painel B, um grupo recebeu o composto 8ML (750 pg/pata) ou veículo na pata direita e outro grupo recebeu a mesma dose do composto 8ML na pata esquerda. Quinze minutos após o tratamento, os animais receberam uma injeção i.pl. de carragenina (300 µg/pata) na pata direita. O limiar mecânico 50% foi avaliado sempre na pata direita dos animais 3h após a aplicação de carragenina utilizando-se filamentos de Von Frey. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. do limiar mecânico 50% (g) (n=6). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com a basal de todos os animais utilizados (###  $p < 0,001$ ) ou tratado com veículo, (\*  $p < 0,1$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.7 EFEITO DO EESAI E DO COMPOSTO 8ML NO TESTE DE PLACA QUENTE E NO DESEMPENHO MOTOR (“ROTA-ROD”)

Os animais também foram avaliados no modelo da placa quente e no desempenho motor pelo “rota-rod”. Os resultados na Figura 15A mostram que EESAL e o composto 8ML, administrados por v.o., na mesma dose que inibiram a nocicepção, 300 mg/kg e 1,8 mg/kg, respectivamente, não aumentaram o tempo de latência sobre a placa aquecida à 54°C, ou seja, não apresentaram nenhum efeito analgésico neste modelo, quando comparado com o grupo de animais tratados com veículo. Por outro lado, o tratamento dos animais com fentanil, aumentou significativamente o tempo de permanência na placa quente quando comparado com o tratamento com veículo (figura 15A).

De forma semelhante, o EESAI e o composto 8ML administrados por v.o. nas mesmas doses de inibição da nocicepção, 300 mg/kg e 1,8 mg/kg respectivamente, não afetaram de forma significativa o desempenho motor dos animais testados, quando comparados com os animais que foram tratados apenas com veículo (grupo controle). Em contrapartida, os animais que foram tratados com Diazepam, apresentaram uma redução significativa da coordenação motora no teste do rota-rod (Figura 15B).

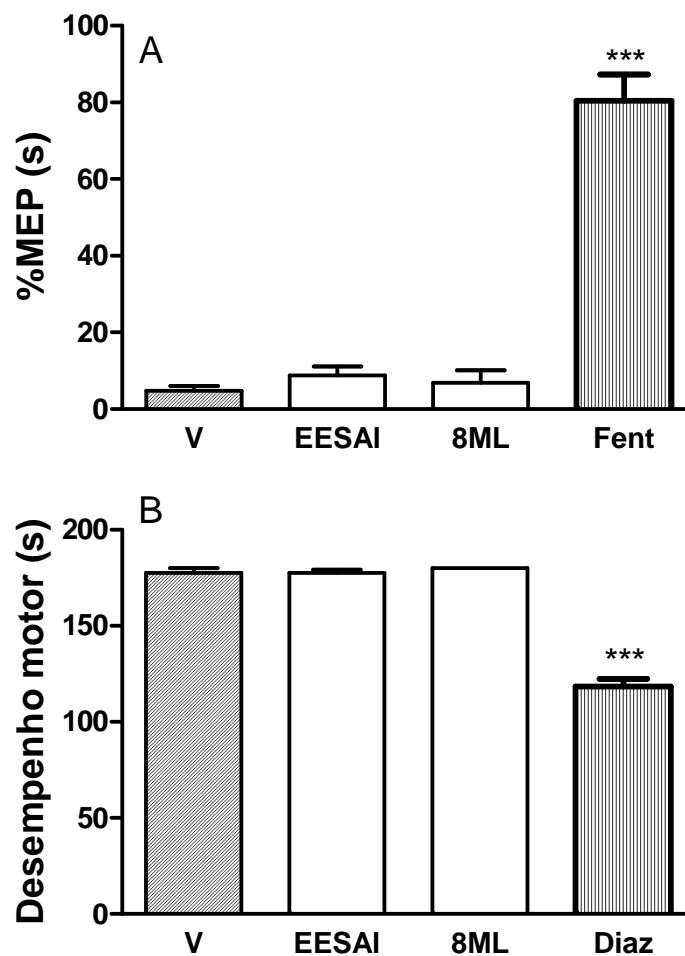


FIGURA 15: EFEITO DO EESAI E DO COMPOSTO 8ML NO TESTE DE PLACA QUENTE E NO DESEMPENHO MOTOR (“ROTA-ROD”) EM CAMUNDONGOS. Os camundongos foram tratados com EESAI (300 mg/kg, v.o.), 8ML (1,8 mg/kg v.o.) ou veículo (V) (Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg). No painel A, o comportamento nociceptivo na placa quente foi avaliado antes e 1 h após o tratamento. Animais controles receberam fentanil (Fent) (100 µg/kg s.c), 15 min antes do teste. No painel B, o desempenho motor foi avaliado 1 h após o tratamento dos animais com EESAI, 8ML ou veículo (V). Animais controles receberam diazepam (Diaz) (5 mg/kg s.c), 15 min antes do teste. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. da % MEP ou do tempo de permanência na barra giratória em segundos. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com o grupo tratado com veículo (\*\*\*)  $p < 0,001$ .



#### 4.8 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E PGE<sub>2</sub>

A fim de se esclarecer melhor como o composto 8ML exerce seu efeito antinociceptivo, o efeito da administração local do composto 8ML também foi avaliado na hiperalgesia mecânica induzida pelo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub>. A administração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou de PGE<sub>2</sub> na pata dos animais causou uma redução no limiar mecânico em torno de 57%, 98% e 98%, respectivamente. Em todos os grupos, o tratamento dos animais com o composto 8ML (750 pg/pata) reverteu completamente a diminuição do limiar mecânico induzido por estes mediadores inflamatórios (Figura 16).

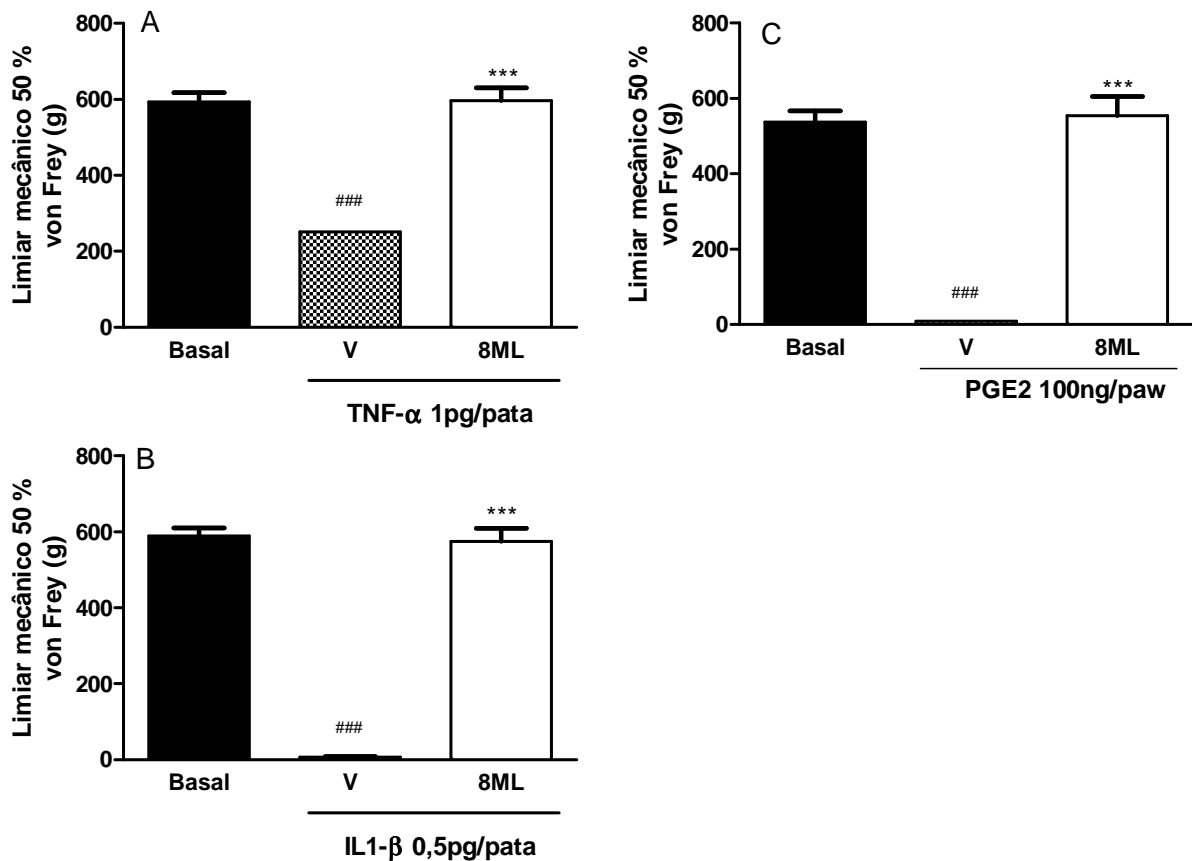


FIGURA 16: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  E PGE<sub>2</sub> EM CAMUNDONGOS. Os animais receberam injeção i.pl. do composto 8ML (750 pg/pata) ou veículo (V) (Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg), na pata direita. Quinze minutos após o tratamento, os animais receberam uma injeção i.pl. de TNF- $\alpha$  (1 pg/pata, painel A), IL-1 $\beta$  (0,5 pg/pata, painel B) ou PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata, painel C), na pata direita. O limiar mecânico foi avaliado 3 h após a administração dos mediadores utilizando-se filamentos de Von Frey. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. do limiar mecânico 50% (g) (n=6). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com a basal de todos os animais utilizados (###  $p < 0,001$ ) ou com o grupo tratado com veículo (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

#### 4.9 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CINC-1 E DOPAMINA

O efeito antinociceptivo do composto 8ML administrado no local também foi avaliado na hiperalgesia mecânica induzido pelo CINC-1 e dopamina. A injeção intraplantar de CINC-1 ou dopamina induziu uma redução no limiar mecânico em torno de 96% nos dois casos em relação ao limiar basal. De maneira contrastante com o que havia sido observado com os outros mediadores inflamatórios, o tratamento dos animais com 8ML na pata não modificou a diminuição do limiar mecânico induzida pelos mediadores (figura 17).

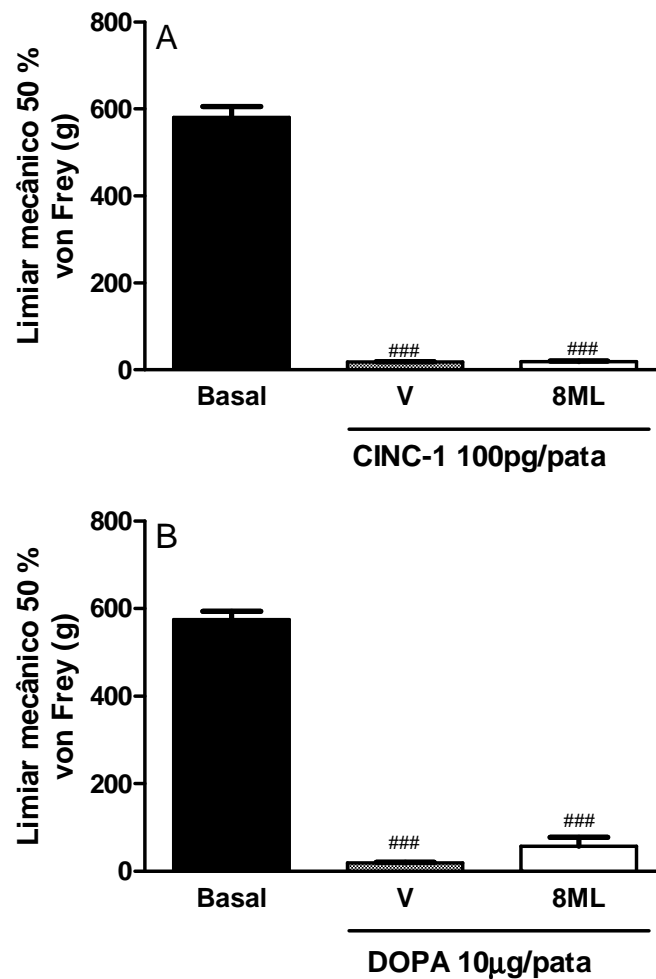


FIGURA 17: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO COMPOSTO 8ML SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CINC-1 OU DOPAMINA EM CAMUNDONGOS. Os animais receberam injeção i.pl. do composto 8ML (750 pg/pata) ou veículo (V) (Tween 80 0,1 % v/v, 10 mL/kg), na pata direita. Quinze minutos após o tratamento os animais receberam uma injeção i.pl. de CINC-1 (100 pg/pata, painel A) ou dopamina (DOPA) (10 µg/pata, painel B), na pata direita. O limiar mecânico foi avaliado 3 h após a administração dos mediadores utilizando-se filamentos de Von Frey. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. do limiar mecânico 50% (g) (n=6). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. Os símbolos demonstram diferença estatística em comparação com a basal de todos os animais utilizados (<sup>###</sup>  $p < 0,001$ ) ou com o grupo tratado com veículo (<sup>\*\*\*</sup>  $p < 0,001$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostram que o extrato etanólico (EESAI) obtido a partir dos tubérculos da *Sinningia allagophylla* tem uma importante atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. A atividade antinociceptiva parece estar relacionada, pelo menos em parte, à redução da sensibilização do nociceptor.

Um composto inédito na literatura encontrado nessa planta chamado de 8-metoxilapachenol (8ML) apresentou tanto atividade anti-inflamatória quanto antinociceptiva, bloqueando, a formação de edema, a nocicepção induzida pela formalina e também a hiperalgesia mecânica induzida pela Cg.

O gênero *Sinningia* é atualmente composto por 68 espécies, das quais cerca de 60 ocorrem no Brasil. O centro de diversidade do gênero é a região sudeste do Brasil, onde a maioria das espécies é encontrada. Essas espécies da *Sinningia* são ervas ou sub-arbustos, apresentando um ciclo anual, com tubérculo perene. Todas as espécies de *Sinningia* produzem belas flores, e por esse motivo apresentam um potencial ornamental muito grande como comentado anteriormente (ARAUJO *et al.*, 2005; UNEMOTO, 2006; CHAUTEMS *et al.*, 2010).

Devido ao grande uso das espécies de *Sinningia* como plantas ornamentais, a *S. allagophylla* é a única que apresenta uma indicação popular como planta medicinal. Suas folhas e flores tem indicação popular como diuréticas e antitérmicas (SEPTÍMIO, 1994), enquanto que os tubérculos são considerados úteis como tônico e emoliente (MORS *et al.*, 2000). O uso popular com indicação antipirética, uma propriedade comum entre alguns medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos (AINEs, por exemplo), associado ao perfil fitoquímico apresentado pelas *Sinningias*, como a grande possibilidade de purificarmos moléculas inéditas na literatura, nos levou a investigar uma possível atividade anti-inflamatória e analgésica da *Sinningia allagophylla*. No início do nosso estudo não havia dados sobre a composição química da *Sinningia allagophylla* e também não há relatos na literatura para corroborar seu uso popular como diurético, antitérmico, tônico ou emoliente ou estudos da atividade anti-inflamatória e analgésica dessa espécie.

Nossos primeiro passo, portanto, foi verificar se o EESAI, em diferentes doses, apresentava atividade anti-inflamatória. Para responder essa questão utilizamos o modelo de edema de pata induzido por Cg. Os estudos iniciais

mostraram que o tratamento dos animais com EESAI, em diferentes doses, reduziu o edema induzido por Cg de uma maneira dose-dependente sendo que a inibição significativa já iniciou nos primeiros 30 min com a dose de 30 e 100mg/kg (figura 9A). Estes dados sugeriram que o EESAI possui um efeito anti-inflamatório importante pois na maior dose utilizada conseguimos um efeito anti-inflamatório bastante significativo (em torno de 60%) e bastante similar ao que se observou com a Dex, um droga com excelente atividade anti-inflamatória.

Considerando esses dados, o próximo passo foi avaliar se o EESAI tinha algum efeito antinociceptivo. Para iniciar os nossos estudos neste tópico começamos a testar o efeito antinociceptivo sobre o comportamento nociceptivo induzido pela formalina. Em nenhum grupo de animais o tratamento apresentou efeito sobre a Fase I da formalina sugerindo que o EESAI não estaria atuando na fase neurogênica da resposta. Porém, em todos os grupos, o tratamento foi eficaz contra a fase inflamatória de formalina, ou Fase II, quando comparado com o grupo veículo (figura 10), uma inibição similar àquela obtida com o controle positivo indometacina. Tanto no experimento de edema de pata induzido por Cg quanto no experimento de nocicepção induzido por formalina, o EESAI foi muito potente no bloqueio de ambas as atividades. Estudos anteriores de nosso laboratório, com outras plantas, como a *Magnolia ovata* e de outros laboratórios com diferentes plantas as doses utilizadas foram mais elevadas, geralmente em torno de 100 a 300 mg/kg do extrato bruto necessários para bloquear essas respostas (DE CAMPOS *et al.*, 1997; MESIA-VELA *et al.*, 2004; KASSUYA *et al.*, 2009). E o EESAI, já bloqueou o edema e a nocicepção na dose de 3 mg/kg. Estes dados sugeriam a presença de substância(s) bastante potente(s) no extrato. Esta potente atividade anti-inflamatória e analgésica somada à diversidade de novas moléculas presentes neste gênero aumentou o nosso interesse para a continuação do estudo. Infelizmente não foi possível testar neste momento a atividade antipirética desta planta mas sem dúvida este será um ponto a ser desenvolvido posteriormente visto a indicação popular (SEPTÍMIO, 1994).

Para dar continuidade à investigação da atividade anti-nociceptiva do EESAI, testamos seu efeito no modelo de hiperalgisia mecânica induzida por Cg uma vez que o efeito do EESAI se restringia basicamente à fase inflamatória da formalina. A Cg, como era esperado causou um diminuição no limiar mecânico dos animais,

como podemos observar no grupo tratado com veículo. Esta redução no limiar já era esperada, pois diversos mediadores inflamatórios participam da hiperalgesia mecânica induzida por Cg em camundongos como por exemplo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , KC, prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (CUNHA *et al.*, 2005) (figura 11). Quando os animais foram tratados com o EESAI na dose de 3 mg/kg, o tratamento não conseguiu inibir a diminuição do limiar mecânico causado pela Cg. Porém nos grupos que foram tratados com o EESAI nas doses de 30 e 300 mg/kg, o tratamento conseguiu reduzir de forma dose-dependente a diminuição do limiar mecânico induzido pela Cg. No entanto, neste modelo experimental, diferente do que foi observado no modelo experimental da formalina, a dose de 3mg/kg foi ineficaz. Isto pode ser explicado pelo fato de que o extrato bruto pode conter mais de uma substância ativa que reduz a nocicepção induzida por formalina, mas nem todas essas substâncias podem reduzir a sensibilização dos nociceptores. Ao medir o limiar mecânico dos animais, é feita basicamente uma avaliação da sensibilização dos nociceptores a estímulos mecânicos e avaliado um comportamento reflexo de retirada, enquanto no modelo de formalina o que é avaliado é um comportamento muito mais elaborado e complexo, que envolve um procedimento bastante específico de lamber e morder a pata.. Em um estudo recente (QIU *et al.*, 2011) mostrou que um derivado do “desiherbaine”, uma toxina isolada de uma esponja marinha, quando administrada por via intratecal foi capaz de bloquear o comportamento induzido pela formalina, mas não a sensibilidade mecânica no mesmo modelo. Assim, é possível que algumas substâncias que bloqueiam o comportamento complexo provocado pela formalina não atuem sobre o processo específico de sensibilização de nociceptores mecânicos. Estes resultados em conjunto sugerem que EESAI possui substância(s) com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. A atividade antinociceptiva está relacionada principalmente à redução da nocicepção inflamatória, particularmente da sensibilização dos nociceptores.

Muitos dos mediadores envolvidos na hiperalgesia mecânica induzida por carragenina (CUNHA *et al.*, 2005) também são capazes de induzir edema de pata ou participam do edema de pata induzido por carragenina (DINARELLO, 2000; UENO e OHISHI, 2001; HASSANEIN *et al.*, 2007). Assim, é possível que o EESAI possua uma substância que bloqueie a síntese ou a ação de um mediador comum a ambas as respostas. Ou ainda, poderiam se tratar de diferentes substâncias.

Nosso próximo passo foi então fracionar o EESAI e analisar as diferentes frações deste extrato. Inicialmente quatro diferentes frações foram preparadas e testadas no modelo de edema de pata induzido por Cg. A dose de cada fração, como é adequado nos estudos de purificação, foi baseada na dose efetiva do EESAI (neste caso de 30mg/kg) e levando-se em conta o rendimento de cada fração. Nessas doses, o tratamento dos animais com as frações não apresentou uma atividade anti-inflamatória significativa. No entanto, quando as doses das frações foram aumentadas duas vezes, todos eles mostraram algum grau de inibição no mesmo modelo (dados não mostrados). Este resultado nos sugeriu que o composto ativo, ou pelo menos um dos compostos ativos, estivesse distribuído em todas as frações, ou seja, a separação do composto ativo presente em 4 frações reduziu a quantidade deste em cada fração não permitindo que nenhuma destas frações tivesse atividade nas doses ideais. No entanto, com o aumento da dose, quantidades significativas de composto ativo estiveram presentes em todas as frações. Esta hipótese foi confirmada pela análise do RMN dessas frações, que mostrou a presença de um composto, em pouca quantidade, em todas as frações.

Por esta razão, um novo processo de fracionamento foi planejado para tentar separar este composto do restante, e o EESAI foi fracionado em apenas duas frações: a fração MeOH e a fração de EP, apresentando um rendimento de 95% e 5%, respectivamente. Levando em conta a dose do EESAI de 30mg/kg e o rendimento de cada fração, foi feito o cálculo da dose a ser aplicada. O tratamento com a fração MeOH não apresentou nenhuma atividade anti-inflamatória significativa na redução do edema induzido por Cg (Figura 12) mesmo contendo 95% dos compostos presentes no EESAI. No entanto, a fração EP foi eficaz na redução do edema induzido por Cg, nas duas doses testadas (Figura 12). Levando-se em conta os resultados da quarta hora após a aplicação de Cg, as doses de 1,5 e 3 mg/kg da fração EP, reduziram a formação do edema em torno de 26% e 33%, respectivamente, quando comparadas com o grupo tratado com veículo. Portanto podemos sugerir que, se os compostos ativos, se é que há mais de um, concentraram-se essencialmente nesta fração. É possível que haja compostos inéditos e ativos na fração MeOH. No entanto, considerando-se que esta fração foi utilizada na mesma dose do EESAI e não apresentou nenhuma atividade é muito pouco provável que haja nesta fração os compostos responsáveis pela atividade



vista no EESAI. O principal composto presente na fração PE, foi isolado sendo caracterizado como 8ML e teve um rendimento de 60%. Considerando-se a dose de 3 mg/kg da fração EP e o rendimento do composto durante o processo de purificação foi calculada a dose a ser administrada nos animais. O composto 8ML também foi eficiente em reduzir a formação de edema induzida pela Cg atingindo a faixa de 44% na quarta hora (Figura 12). Estes resultados sugerem que o composto 8ML é, pelo menos em parte, responsável pela atividade anti-inflamatória presente no EESAI. Levando-se em conta esses resultados a dose de 3 mg/kg da fração EP e a dose de 1,8 mg/kg do composto 8ML foram utilizadas para dar continuidade aos estudos.

Em seguida avaliamos a atividade da fração EP e do composto 8ML na hiperalgesia mecânica induzida pela Cg. O grupo que foi tratado com veículo, a Cg, diminuiu em  $75 \pm 4\%$  o limiar mecânico (Figura 13). Tanto o tratamento com a fração EP quanto com o composto 8ML reverteram completamente a diminuição do limiar mecânico induzido pela Cg (Figura 13). Estes resultados sugerem que o composto 8ML é também, pelo menos em parte, responsável pela atividade analgésica observada no EESAI. Nós não testamos os possíveis efeitos anti-nociceptivos da fração MeOH. Assim, é possível que outros compostos com esta atividade estejam presentes nesta fração. Por isso mais estudos dessa fração precisam ser realizados para tirar conclusões mais precisas. De qualquer maneira, nos parece claro que o composto 8ML possivelmente exerce seus efeitos anti-inflamatório e analgésico através do mesmo mecanismo, ou seja, reduzindo a síntese ou a ação de um mediador ou processo comum importante para a formação do edema e para a sensibilização do terminal nociceptivo.

O composto 8ML é um composto inédito descrito por nosso grupo (RIVA, 2011) e ele é um derivado do composto lapachenol, um composto mais conhecido. O lapachenol foi extraído pela primeira vez de *Lippia graveolins* e foi caracterizado por LIVINGSTONE E WHITING (1955) e sua estrutura cristalina e molecular foi descrita por REIBENSPIES *et al.*, (1989). Ele tem sido usado para a rotulagem de fotoafinidade do citocromo P450 3A<sub>4</sub>, pois sem fotólise pode ser metabolizado por esta enzima (WEN *et al.*, 2005). No entanto na literatura não existe nenhuma atividade farmacológica atribuída ao lapachenol.

A sensibilização do nociceptor induzida por Cg frente a um estímulo mecânico em camundongos mostrou ser dependente de vários mediadores inflamatórios, incluindo a bradicinina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CINC-1, prostaglandinas e aminas simpáticas (CUNHA *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2007). Como dito anteriormente, alguns destes mediadores como a bradicinina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e prostaglandinas também estão envolvidos na formação de edema induzida pela Cg em camundongos (SUZUKI *et al.*, 1995; ASANO *et al.*, 1997; POSADAS *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2006). Portanto, existem vários alvos onde o composto 8ML pode estar atuando para reduzir a sensibilização dos nociceptores e a formação de edema.

O objetivo seguinte foi obter pistas sobre o mecanismo de ação do composto 8ML, presente no EESAI. Já que o EESAI não bloqueou a primeira fase da nocicepção induzida por formalina, nós sugerimos que o EESAI e o composto 8ML estariam agindo periféricamente e não no sistema nervoso central para produzir analgesia. Para confirmar a ação periférica do composto 8ML na sensibilização das fibras nociceptivas, avaliamos a eficácia através da administração local do composto 8ML no modelo de hiperalgisia mecânica induzida por Cg. Os resultados mostraram que o composto 8ML inibiu a redução do limiar mecânico de maneira dose-dependente. No grupo que recebeu o tratamento de 0,75 pg/pata do composto 8ML, o tratamento não foi capaz de inibir a diminuição do limiar mecânico induzido pela Cg enquanto que com as doses de 7,5 e 75 pg/pata do composto 8ML, o tratamento inibiu esta diminuição do limiar mecânico em torno de 60-70% atingindo o bloqueio completo com a dose de 750 pg/pata (figura 14A). Estes dados sugeriram que o composto possuía uma ação local, particularmente devido às baixas doses que foram necessárias para a redução da hiperalgisia. No entanto, fez-se necessário descartar definitivamente a necessidade da administração sistêmica para se obter efeito.

Para responder essa questão, um grupo de animais recebeu uma injeção local de veículo na pata direita, outro grupo foi tratado com uma injeção local do composto 8ML (na maior dose que apresentou efeito analgésico e que portanto com maior potencial de causar um efeito sistêmico, ou seja, a dose de 750 pg/pata) na pata esquerda e outro grupo na pata direita (controle, idêntico ao experimento anterior). Quinze minutos após esse tratamento todos os grupos receberam uma injeção de Cg na pata direita. Três horas após essa injeção o limiar mecânico foi

medido, sempre na pata direita. O tratamento com 8ML na pata esquerda não modificou a redução do limiar mecânico, induzida pela Cg (figura 14B). Porém, o tratamento com 8ML na pata direita (ou seja, na mesma pata que recebeu o estímulo inflamatório) reverteu completamente à diminuição do limiar mecânico (figura 14B). Esses dados confirmam que o composto 8ML age no sítio inflamatório para reduzir a sensibilização de fibras nervosas nociceptivas e não depende de um efeito sistêmico. Estudos adicionais devem ser feitos para definir o mecanismo de ação do composto e tirar conclusões mais precisas. Embora não tenhamos avaliado a toxicidade do EESAI ou do composto 8ML, os animais não apresentaram sinais evidentes de intolerância ou intoxicação nas doses utilizadas neste estudo. No entanto, mais estudos com doses mais elevadas e esquemas de administração mais prolongados são necessários.

Para confirmar o efeito de ação local tanto do EESAI quanto do composto 8ML, e para ter certeza que eles não possuem uma atividade no SNC, utilizamos o modelo de placa quente. Os animais foram tratados com o EESAI e com o composto 8ML, nas mesmas doses que apresentaram efeito anti-nociceptivo na hiperalgesia mecânica induzida por Cg. Os resultados mostram que nem o tratamento com o EESAI nem o tratamento com o composto 8ML provocaram um aumento no tempo de latência dos animais quando comparados com o basal. A eficácia de drogas que atuam como analgésicas no SNC já estão bem documentadas e entre elas estão os opióides, canbinóides e agonistas serotoninérgicos (STOTT e PLEUVRY, 1991; THOMPSON *et al.*, 2000; OZDOGAN *et al.*, 2006; KAYSER *et al.*, 2007; SEYREK *et al.*, 2010). Já o grupo que foi tratado com fentanil, um opióide usado nesse modelo como controle positivo, o tratamento provocou um aumento significativo no tempo de latência dos animais (Figura 15A). Podemos concluir assim que tanto o EESAI e o composto 8ML não apresentam uma ação no SNC e sim uma ação periférica, preferencialmente atuando diretamente na redução da sensibilização periférica do nociceptor.

A atividade anti-nociceptiva do EESAI e do composto 8ML foi avaliada pela mudança no comportamento nociceptivo dos animais, o que exige um desempenho motor intacto em ambos os modelos utilizados, tanto no modelo de nocicepção induzido pela formalina quanto no modelo de hiperalgesia mecânica induzido pela Cg. Deve-se notar que o intervalo de doses, onde EESAI e o composto 8ML foram

eficazes nos modelos de nocicepção foram as mesmas que foram eficazes no modelo de edema de pata induzido pela Cg, sendo que esse modelo não depende do desempenho motor dos animais. Este foi o primeiro indicativo de que o extrato e o composto estavam realmente agindo como analgésicos. Para confirmar que o desempenho motor dos animais não foi afetado pelo EESAI ou pelo composto 8ML, os animais foram submetidos ao modelo de desempenho motor pelo rota-rod após receberem o tratamento com EESAI e do composto 8ML nas mesmas doses que apresentaram os efeitos analgésicos. Nem o EESAI nem 8ML modificou o desempenho motor dos animais na tarefa de rota-rod, quando comparados com o grupo que foi tratado com veículo. Por outro lado, quando os animais foram tratados com Diazepam, usado nesse modelo experimental como controle positivo, o tratamento reduziu de forma significativa a coordenação motora no teste do rota-rod (Figura 15B). Através desse resultado podemos sugerir que o efeito de ambos, extrato e do composto 8ML trata-se realmente de uma atividade anti-nociceptiva pois excluímos a idéia de algum comprometimento motor.

Para estudar o possível mecanismo de ação do composto 8ML partimos para o estudo do efeito anti-nociceptivo na cascata proposta por CUNHA *et al.*, (2005). De acordo com o modelo proposto, após a aplicação da Cg, pode ocorrer a ativação de duas vias, uma que depende de prostaglandinas e outra que não depende. Na via que depende de prostaglandinas, a Cg pode induzir a liberação de TNF- $\alpha$ , que por sua vez induz a liberação de IL-1 $\beta$ , que, por aumentar a expressão de COX-2 pode induzir a síntese de prostaglandinas e essas causarem a sensibilização dos nociceptores. Na outra via, a Cg promove a liberação de KC que induz a liberação de IL-1 $\beta$ , e seguir a via anterior, ou a KC pode induzir a liberação de aminas simpáticas, e essas aminas que vão causar a sensibilização de nociceptores. Portanto para entender o possível mecanismo de ação do composto 8ML, nós tratamos os animais com 8ML, injeção local e administramos TNF- $\alpha$ , ou IL-1 $\beta$ , ou PGs, ou CINC-1, que é uma quimiocina específica de ratos e é homóloga a IL-8 humana, ou DOPA. Com base nos resultados percebemos que tanto o TNF- $\alpha$ , quanto a IL-1 $\beta$  e a PGE2, causaram uma diminuição no limiar mecânico dos animais, quando esses foram tratados com veículo. E o tratamento com o composto 8ML conseguiu, nos três casos, reverter completamente a diminuição do limiar mecânico causado pelos mediadores (Figura 16). Estes dados sugerem que o

composto 8ML está bloqueando a síntese/liberação ou ação de algo que é gerado após as prostaglandinas para causar a sensibilização do nociceptor. Portanto, neste sentido, podemos excluir a possibilidade de que o composto 8ML esteja causando a inibição da COX-2 de maneira similar aos anti-inflamatórios não esteroidais.

Como era esperado a administração de CINC-1 e de DOPA, também causou uma diminuição do limiar mecânico dos animais, quando eles foram tratados somente com veículo. Entretanto, o tratamento com o composto 8ML não conseguiu inibir a diminuição do limiar mecânico causado por esses mediadores. Levando-se em conta esses resultados podemos sugerir que o composto 8ML deve estar atuando em algum ponto bastante específico para causar analgesia e que esta relacionado principalmente com o componente prostanóide na sensibilização dos nociceptores. Na verdade ele atua em algum dos eventos após a liberação de PGs possivelmente em mecanismos intracelulares mas que não são ativados através do componente simpático. É possível que este também seja o mecanismo pelo qual este composto exerce sua atividade anti-inflamatória uma vez que prostaglandinas podem potencializar o edema por causarem vasodilatação (UENO e OHISHI, 2001).

Em resumo, apesar da *Sinningia* não apresentar uma indicação popular como anti-inflamatória ou analgésica, o presente estudo mostra que o EESAI e o composto 8ML tem atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. Se essas atividades estão relacionadas à atividade antipirética, popularmente conhecida desta planta, é uma questão a ser mais bem estudada. Estas atividades estão, pelo menos em parte associadas à presença do composto 8ML que age particularmente no componente prostaglandina responsável pela sensibilização dos nociceptores. Estudos adicionais precisam ser feitos para tentar entender e determinar o mecanismo de ação deste composto.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que tanto o EESAI quanto o composto 8ML apresentam uma importante atividade antiedematogênica avaliada no modelo de edema de pata induzido por Cg.

Tanto o EESAI quanto o composto 8ML apresentam uma potente atividade antinociceptiva contra estímulos produzidos por formalina e carragenina em camundongos. O presente estudo também confirmou que tanto o EESAI quanto o composto 8ML, não causam sedação, não agem no Sistema Nervoso Central e possui uma ação local e não sistêmica.

Esse estudo também mostrou que o possível efeito de ação anti-nociceptiva do composto 8ML, parece estar relacionado ao componente prostaglandinas na sensibilização dos nociceptores. Porém, mais estudos são necessários, para validar sua indicação popular como antipirética e também, para entender melhor o mecanismo de ação do composto 8ML e ainda para testar sua não toxicidade nas doses utilizadas.

## REFERÊNCIAS

- AKBARI, E. The role of cyclo-oxygenase inhibitors in attenuating opioid-induced tolerance, hyperalgesia, and dependence. *Med Hypotheses* [S.I.], Oct 31 2011.
- ALMEIDA, T. F. *et al.* Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* [S.I.], v. 1000, n. 1-2, p. 40-56, Mar 12 2004.
- ARAUJO, A. O. *et al.* Gesnereaceae da cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasil. Bot.* [S.I.], v. 28, n. 1, p. 139-135, 2005.
- ASANO, M. *et al.* Effects of a nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR167344, on different in vivo animal models of inflammation. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 122, n. 7, p. 1436-40, Dec 1997.
- BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* [S.I.], v. 14, n. 12, p. 436-41, Dec 1993.
- BASSO, L. A. *et al.* The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [S.I.], v. 100, n. 6, p. 475-506, Oct 2005.
- BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol* [S.I.], v. 277, n. 2, p. 302-12, Nov 8 1988.
- BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* [S.I.], v. 67, n. 1, p. 67-186, Jan 1987.
- BIRRELL, G. J. *et al.* PGI<sub>2</sub>-induced activation and sensitization of articular mechanonociceptors. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 124, n. 1, p. 5-8, Mar 11 1991.
- BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Ther* [S.I.], v. 111, n. 1, p. 194-223, Jul 2006.
- BOTTING, R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res* [S.I.], v. 110, n. 5-6, p. 269-72, Jun 15 2003.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 33, n. 2, p. 179-89, Feb 2000.

CHANDRASEKHARAN, N. V. *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 99, n. 21, p. 13926-31, Oct 15 2002.

CHAPLAN, S. R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* [S.I.], v. 53, n. 1, p. 55-63, Jul 1994.

CHAUTEMS, A. *et al.* Taxonomic revision of *Sinningia* Nees (Gesneriaceae) IV: six new species from Brazil and a long overlooked taxon. *Candollea* [S.I.], v. 65, n. 2, p. 241-266, 2010.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. *J Pain* [S.I.], v. 1, n. 3 Suppl, p. 35-44, Sep 2000.

COUTAUX, A. *et al.* Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* [S.I.], v. 72, n. 5, p. 359-71, Oct 2005.

CRONSTEIN, B. N.; WEISSMANN, G. Targets for antiinflammatory drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [S.I.], v. 35, p. 449-62, 1995.

CUNHA, F. Q. *et al.* Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 104, n. 3, p. 765-7, Nov 1991.

CUNHA, F. Q. *et al.* The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 107, n. 3, p. 660-4, Nov 1992.

CUNHA, T. M. *et al.* TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 573, n. 1-3, p. 221-9, Nov 14 2007.

CUNHA, T. M. *et al.* Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008.

CUNHA, T. M. *et al.* A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb 1 2005.

DAMTOFT, S.; JENSEN, S. R. Three phenylethanoid glucosides of unusual structure from *Chirita sinensis* (gesneriaceae). *Phytochemistry* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 441-443, 1994.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur J Med Chem* [S.I.], v. 36, n. 2, p. 109-26, Feb 2001.



DE BOSSCHER, K. *et al.* The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* [S.I.], v. 24, n. 4, p. 488-522, Aug 2003.

DE CAMPOS, R. O. *et al.* Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). *Life Sci* [S.I.], v. 61, n. 16, p. 1619-30, 1997.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. *Chest* [S.I.], v. 118, n. 2, p. 503-8, Aug 2000.

DINARELLO, C. A. *et al.* Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res* [S.I.], v. 562, n. 2, p. 199-206, Oct 25 1991.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [S.I.], v. 20, p. 441-62, 1980.

DOMINGUEZ, S. X. A. *et al.* Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Med.* [S.I.], v. 55, p. 208-209, 1989.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* [S.I.], v. 75, n. 2, p. 125-31, Aug 1995.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol* [S.I.], v. 75, n. 6, p. 704-12, Jun 1997.

DRAY, A.; BEVAN, S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *Trends Pharmacol Sci* [S.I.], v. 14, n. 8, p. 287-90, Aug 1993.

DUARTE, I. D. *et al.* Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 217, n. 2-3, p. 225-7, Jul 7 1992.

DUARTE, I. D.; FERREIRA, S. H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 221, n. 1, p. 171-4, Oct 6 1992.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)* [S.I.], v. 46, n. 3, p. 208-9, Mar 1957.

DURAN, W. N. *et al.* The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc Res* [S.I.], v. 87, n. 2, p. 254-61, Jul 15 2010.

DVORAK, H. F. Vascular permeability to plasma, plasma proteins, and cells: an update. *Curr Opin Hematol* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 225-9, May 2010.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* [S.I.], v. 107, n. 3, p. 385-93, Mar 1953.

FERREIRA, S. H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs* [S.I.], v. 46 Suppl 1, p. 1-9, 1993.

FERREIRA, S. H. *et al.* The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 201, n. 1, p. 121-2, Aug 16 1991.

FERRIS, S. H. Switching previous therapies for Alzheimer's disease to galantamine. *Clin Ther* [S.I.], v. 23 Suppl A, p. A3-7, 2001.

GALLIN, J. I. *et al.* Delineation of the phagocyte NADPH oxidase through studies of chronic granulomatous diseases of childhood. *Curr Opin Immunol* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 53-6, Feb 1992.

GEBHART, G. F. Visceral polymodal receptors. *Prog Brain Res* [S.I.], v. 113, p. 101-12, 1996.

GILROY, D. W. *et al.* Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* [S.I.], v. 3, n. 5, p. 401-16, May 2004.

GONZALES, A. G. *et al.* Química de las Rubiaceas. II Componentes de la *Putoria calabrica* Perss. *Anales de Química* [S.I.], v. 73, p. 538-545, 1976.

GOTTLIEB, O. R. Ethnopharmacology versus chemosystematics in the search for biologically active principles in plants. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 6, n. 2, p. 227-38, Sep 1982.

GUHA, P. K.; BHATTACHARYYA, A. 5,8-Dihydroxy-7-methoxyflavone from the immature leaves of *Didymocarpus pedicellata*. *Phytochemistry* [S.I.], v. 31, n. 5, p. 1833-1834, 1992.

HARIZI, H. *et al.* Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* [S.I.], v. 14, n. 10, p. 461-9, Oct 2008.

HASSANEIN, N. M. *et al.* Role of interleukin-1beta and nitric oxide in the antiinflammatory dynamics of acetylsalicylic acid in carrageenan-induced paw oedema model. *Egypt J Immunol* [S.I.], v. 14, n. 2, p. 123-33, 2007.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* [S.l.], v. 30, n. 1, p. 103-14, Jul 1987.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* [S.l.], v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 13 2001.

KASSUYA, C. A. *et al.* Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *J Ethnopharmacol* [S.l.], v. 124, n. 3, p. 369-76, Jul 30 2009.

KAYSER, V. *et al.* Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT1A<sup>-/-</sup>, 5-HT1B<sup>-/-</sup>, 5-HT2A<sup>-/-</sup>, 5-HT3A<sup>-/-</sup> and 5-HTT<sup>-/-</sup> knock-out male mice. *Pain* [S.l.], v. 130, n. 3, p. 235-48, Aug 2007.

KRESS, M. *et al.* Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro. *J Neurophysiol* [S.l.], v. 68, n. 2, p. 581-95, Aug 1992.

KUBES, P. Polymorphonuclear leukocyte--endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. *Can J Physiol Pharmacol* [S.l.], v. 71, n. 1, p. 88-97, Jan 1993.

KUMAR, V. *et al.* *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th ed. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

KVIST, L. P.; PEDERSEN, J. A. Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family gesneriaceae determined by EPR spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology* [S.l.], v. 14, n. 4, p. 385-405, 1986.

LE BARS, D. *et al.* Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* [S.l.], v. 53, n. 4, p. 597-652, Dec 2001.

LENT, R. *Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência*. São Paulo: Atheneu., 2004.

LEVINE, J. D. *et al.* Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. *Nature* [S.l.], v. 323, n. 6084, p. 158-60, Sep 11-17 1986.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet* [S.l.], v. 353, n. 9164, p. 1607-9, May 8 1999.

LORENZETTI, B. B. *et al.* Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *Eur Cytokine Netw* [S.I.], v. 13, n. 4, p. 456-61, Oct-Dec 2002.

LUTTOSCH, F.; BAERWALD, C. [Treatment of pain in rheumatic diseases]. *Dtsch Med Wochenschr* [S.I.], v. 136, n. 31-32, p. 1598-600, Aug 2011.

MAO, J.; CHEN, L. L. Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. *Pain* [S.I.], v. 87, n. 1, p. 7-17, Jul 2000.

MARKENSON, J. A. Mechanisms of chronic pain. *Am J Med* [S.I.], v. 101, n. 1A, p. 6S-18S, Jul 31 1996.

MARKIEWICZ, M.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Comparative model studies of gastric toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Langmuir* [S.I.], v. 27, n. 11, p. 6950-61, Jun 7 2011.

MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [S.I.], v. 49, p. 265-90, 2009.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* [S.I.], v. 86, n. 1, p. 279-367, Jan 2006.

MESIA-VELA, S. *et al.* Pharmacological study of *Stachytarpheta cayennensis* Vahl in rodents. *Phytomedicine* [S.I.], v. 11, n. 7-8, p. 616-24, Nov 2004.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* [S.I.], v. 57, n. 1, p. 1-164, Jan 1999.

MORI, L. S. Antiinflammatory and antinociceptive activity of ethanolic extract from *Sinningia allagophylla* and *S. aggregata*. *Resumos do 40 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*. n.

. Águas de Lindóia 2008.

MORI, L. S. *et al.* Analgesic effects of the ethanolic extract from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae) trunk bark and of N-acetylxylopine, a semi-synthetic analogue of xylopine. *Phytomedicine* [S.I.], v. 18, n. 2-3, p. 143-7, Jan 15 2011.

MORS, W. B. *et al.* *Medicinal plants of Brazil*. Algonac, Michigan: Reference Publ., Inc., 2000.

NAGY, J. A. *et al.* Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* [S.I.], v. 11, n. 2, p. 109-19, 2008.

NEWMAN, D. J. *et al.* Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Products* [S.I.], v. 66, n. 7, p. 1022-37, Jul 2003.

O'BANION, M. K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 45-82, 1999.

O'NEILL, G. P.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* [S.I.], v. 330, n. 2, p. 156-60, Sep 13 1993.

OLSSON, Y. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. *Crit Rev Neurobiol* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 265-311, 1990.

OZDOGAN, U. K. *et al.* The analgesic efficacy of partial opioid agonists is increased in mice with targeted inactivation of the alpha2A-adrenoceptor gene. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 529, n. 1-3, p. 105-13, Jan 4 2006.

PAIRET, M.; ENGELHARDT, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol* [S.I.], v. 10, n. 1, p. 1-17, 1996.

PERRET, M. *et al.* Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidence from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear ncpGS. *Am J Bot* [S.I.], v. 90, n. 3, p. 445-60, Mar 2003.

PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. *Microcirculation* [S.I.], v. 7, n. 3, p. 147-61, Jun 2000.

PHILLIPSON, J. D.; ANDERSON, L. A. Ethnopharmacology and Western medicine. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 25, n. 1, p. 61-72, Feb 1989.

POSADAS, I. *et al.* Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 142, n. 2, p. 331-8, May 2004.

POWER, I. An update on analgesics. *Br J Anaesth* [S.I.], v. 107, n. 1, p. 19-24, Jul 2011.

QIU, C. S. *et al.* Antinociceptive effects of MSVIII-19, a functional antagonist of the GluK1 kainate receptor. *Pain* [S.I.], v. 152, n. 5, p. 1052-60, May 2011.

REIBENSPIES, J. H. *et al.* Crystal and molecular structure of lapachenole. *J. Cryst. Spec. Res.* [S.I.], v. 19, p. 597-602, 1989.

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain* [S.I.], v. 100, n. 1-2, p. 1-6, Nov 2002.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* [S.I.], v. 353, n. 16, p. 1711-23, Oct 20 2005.

RIVA, D. Isolation of a new derivative of naphthalene of *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae). *34th Annual Meeting of the Brazilian Chemical Society*. Florianópolis, PR, Brasil.2011.

ROCHA, A. C. *et al.* Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 148, n. 5, p. 688-95, Jul 2006.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* [S.I.], v. 3, p. 99-126, 2008.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. *Annu Rev Med* [S.I.], v. 49, p. 123-33, 1998.

SANDKUHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* [S.I.], v. 89, n. 2, p. 707-58, Apr 2009.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. *J Physiol* [S.I.], v. 403, p. 91-104, Sep 1988.

SCHMEDA-HISCHMANN, G.; PAPASTERGIOU, F. Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug "Tayi Pytá" (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). *Z. Naturforsch. C.* [S.I.], v. 58, p. 495-501, 2003.

SCHMIDT, R. *et al.* Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* [S.I.], v. 15, n. 1 Pt 1, p. 333-41, Jan 1995.

SEPTÍMIO, L. R. *As plantas: nome vulgar, caracterização botânica, uso terapêutico.* . Brasília: SIPE - Secretaria de Intercâmbio e Projetos Especiais, 1994. (A fitoterapia brasileira baseada em ervas medicinais do Cerrado).

SERHAN, C. N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* [S.I.], v. 21, n. 2, p. 325-32, Feb 2007.

SEYREK, M. *et al.* Systemic cannabinoids produce CB-mediated antinociception by activation of descending serotonergic pathways that act upon spinal 5-HT(7) and 5-HT(2A) receptors. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 649, n. 1-3, p. 183-94, Dec 15 2010.

SNIDER, W. D.; MCMAHON, S. B. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* [S.I.], v. 20, n. 4, p. 629-32, Apr 1998.

SOARES, A. C. *et al.* Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 400, n. 1, p. 67-71, Jul 14 2000.

STADNYK, A.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. *Immunol Today* [S.I.], v. 12, n. 3, p. A7-12, Mar 1991.

STEFANELLO, M. *et al.* Óleo essencial de *Sinnigia aggregata* *Revista Brasileira de Farmacognosia* [S.I.], v. 15, n. 4, p. 331-333, 2005.

STEFANELLO, M. E. A. *Avaliação Estatística de Plantas Medicinais: Química, Farmacologia e Sistemática*. . (2003). USP, São Paulo, 2003.

STOTT, D. G.; PLEUVRY, B. J. Relationship between analgesia and respiratory depression for mu opioid receptor agonists in mice. *Br J Anaesth* [S.I.], v. 67, n. 5, p. 603-7, Nov 1991.

SUZUKI, Y. *et al.* An interleukin-1 binding region oligopeptide from the human type I IL-1 receptor reduces acute inflammation, delayed hypersensitivity reaction, and lethal endotoxemia in animals. *J Interferon Cytokine Res* [S.I.], v. 15, n. 12, p. 1083-8, Dec 1995.

SWINNY, E. E. *et al.* <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for the 3-deoxyanthocyanins, luteolinidin-5-glucoside and apigeninidin-5-glucoside. *Magnetic Resonance in Chemistry* [S.I.], v. 38, p. 1031-1033, 2000.

THOMPSON, S. J. *et al.* Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein. *Anesthesiology* [S.I.], v. 92, n. 5, p. 1392-9, May 2000.

TREEDE, R. D. *et al.* Comparison of heat and mechanical receptive fields of cutaneous C-fiber nociceptors in monkey. *J Neurophysiol* [S.I.], v. 64, n. 5, p. 1502-13, Nov 1990.

TROWBRIDGE, H. O. E., ROBERT C. *Inflammation: a review of the process*. 5th ed. ed. Chicago: Quintesse Pub. CO., 1997.

TUROLLA, M. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev Bras Cienc Farm* [S.l.], v. 42, p. 289-306, 2006.

UENO, A.; OHISHI, S. [Inflammation-allergy and prostanoids. (1). Prostanoids in experimental inflammatory reaction]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* [S.l.], v. 117, n. 4, p. 255-61, Apr 2001.

UNEMOTO, L. K. Estabelecimento de um protocolo para a propagação in vitro de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore (Gesneriaceae). . v. 28: *Acta Sci. Agron.*, 2006. p. 503-506.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* [S.l.], v. 231, n. 25, p. 232-5, Jun 23 1971.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res* [S.l.], v. 44, n. 1, p. 1-10, Jan 1995.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol Suppl* [S.l.], v. 102, p. 9-21, 1996.

VERDAN, M. H. *et al.* Lactones and Quinones from the Tubers of *Sinningia aggregata*. *J. Nat. Products* [S.l.], v. 73, n. 8, p. 1434-1437, Aug 2010.

VERDAN, M. H. *et al.* Anthraquinones and ethylcyclohexane derivatives from *Sinningia speciosa* "Fyfiana". *Biochem. Syst. Ecol.* [S.l.], v. 37, n. 1, p. 40-42, 2009.

WEIGERT, A. *et al.* The liaison between apoptotic cells and macrophages--the end programs the beginning. *Biol Chem* [S.l.], v. 390, n. 5-6, p. 379-90, May-Jun 2009.

WEN, B. *et al.* Fluorescent photoaffinity labeling of cytochrome P450 3A4 by lapachenole: identification of modification sites by mass spectrometry. *Biochemistry* [S.l.], v. 44, n. 6, p. 1833-45, Feb 15 2005.

WOOLF, C. J. Pain. *Neurobiol Dis* [S.l.], v. 7, n. 5, p. 504-10, Oct 2000.

YANG, L. *et al.* The anthraquinones of *Rhynchoetechum vestitum*. *Phytochemistry* [S.l.], v. 47, n. 2, p. 315-317, 1998.

ZAITLIN, D.; PIERCE, A. J. Nuclear DNA content in *Sinningia* (Gesneriaceae); intraspecific genome size variation and genome characterization in *S. speciosa*. *Genome* [S.l.], v. 53, n. 12, p. 1066-1082, 2010/12/01 2010.



ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *Journal of Thermal Biology* [S.I.], v. 24, p. 39, 1999.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 109-10, Jun 1983.