

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
LUIS ALEXANDRE LOMBA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA, ANTINOCICEPTIVA E
ANTIPIRÉTICA DA *Sinningia canescens* EM CAMUNDONGOS.

CURITIBA
2015

LUIS ALEXANDRE LOMBA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA, ANTINOCICEPTIVA E ANTIPIRÉTICA DA *Sinningia canescens* EM CAMUNDONGOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander R. Zamprônio

CURITIBA
2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Lomba, Luis Alexandre

Avaliação da atividade antiedematogênica, antinociceptiva e antipirética da *Sinningia canescens* em camundongos. / Luis Alexandre Lomba. – Curitiba, 2015.

94f.: il. ; 30cm.

Orientador: Aleksander Zamprônio

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

1. Plantas. 2. Farmacologia. I. Título II. Zamprônio, Aleksander. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1

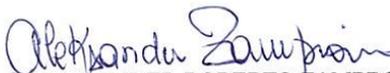


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

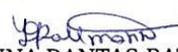
PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LUIS ALEXANDRE LOMBA**, intitulada: "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEMATOMOGÊNICA, ANTINOCICEPTIVA E ANTIPIRÉTICA DA *Sinningia Canescens* EM CAMUNDONGOS.**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua ^{APROVAÇÃO}....., completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Mestre em FARMACOLOGIA**.

Curitiba, 22 de Setembro de 2015.


Prof ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO
(Presidente da Banca Examinadora)


Prof JOICE MARIA DA CUNHA


Prof YANNA DANTAS RATTMANN

**Dedico esta dissertação ao meu
companheiro, Luís Felipe. Meu eterno
muito obrigado.**

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao meu orientador, professor Aleksander Zamprônio, pela oportunidade de ser seu aluno novamente. Quero agradecer principalmente pelos ensinamentos e pelo seu padrão de excelência e de cuidados. Nossa convivência foi uma revelação quanto ao profissionalismo e dedicação; muito obrigado.

Agradeço aos meus pais, por terem me dado à oportunidade e pelo grande esforço feito para que pudesse frequentar boas escolas, esforço que agora reconheço e agradeço imensamente.

Aos meus avós, que certamente estão muito orgulhosos e que continuam torcendo. Minha ausência se justifica em momentos como este. Obrigado por ensinar, mesmo que a sua maneira, que a vida de fato não é fácil, mas que vale a pena; e que podemos ser felizes mesmo que as coisas não sejam exatamente como imaginávamos.

Aos meus amigos que muito me ajudaram com as conversas e companheirismo diários, tanto nas rotinas de trabalho quanto nas horas de folga, muito bom tê-los ao meu lado. Muito me orgulha a disposição que vocês tem em mostrar sempre o que é a amizade, o quanto ela resiste ao tempo; e que amizade verdadeira independente de circunstâncias.

Aos colegas do departamento, por compartilhar conhecimento e tornar o trabalho muito mais agradável.

Aos professores e funcionários do departamento pela prontidão em ajudar e por contribuírem com a minha formação. Às funcionárias do biotério, Gilmara e Luana, pela compreensão.

Aos animais, sem os quais a ciência não seria possível, meu respeito e gratidão. Enfim, obrigado pelas pessoas que torcem não só pelo melhor, mas principalmente pelo que é mais justo.

“Existem almas vivas que, pela energia de seu amor, comunicam vida a tudo o que se aproxima dela. E existem almas que, por baixo de uma aparência externa de vida, estão mortas, e congelam em sua própria morte tudo o que se aproxima delas.” (Henry Corbin)

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

Este estudo avaliou as propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e antipirética do extrato bruto de *Sinningia canescens*, suas frações e da naftoquinona isolada da fração hexano 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona em camundongos machos *Swiss*. O extrato bruto, nas doses de 30 e 100 mg/Kg por via oral, reduziu o edema de pata induzido pela carragenina (Cg) em 66% e 68%, respectivamente, na quarta hora, as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em 60,3% e 74,8%, a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina em 36,8% e 38,4% e a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina com a dose de 30 mg/Kg em 88,2%. Doses menores, 3 e 10 mg/Kg, não tiveram efeito. O extrato bruto, na dose de 30 mg/Kg, também reverteu a febre induzida pela administração de lipopolissacarídeo (LPS), sem alterar a temperatura corporal normal dos animais. O extrato bruto nas doses de 10 e 30 mg/kg inibiu o aumento da concentração plasmática de fator de necrose tumoral α (TNF- α) induzido por LPS em 53% e 66% respectivamente. O extrato bruto não alterou o desempenho motor avaliado pelo teste de Rota-rod na menor dose antinociceptiva testada, 30 mg/Kg, e também não aumentou o tempo de latência dos animais no teste da placa quente na mesma dose. As frações diclorometano e hexano nas doses de 2,5 e 2 mg/kg por via oral, respectivamente, inibiram a formação do edema de pata e a hiperalgesia mecânica induzidos pela Cg bem como a febre induzida pela administração de LPS. As frações butanol e acetato de etila não apresentaram efeito em nenhum destes testes em doses baseadas no rendimento de cada fração. O composto isolado, uma naftoquinona majoritária das frações diclorometano e hexano, a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona (CI), foi avaliado quanto ao seu efeito antiedematogênica, antinociceptivo e antipirético, além do seu efeito sobre as concentrações de plasmáticas de TNF- α , interleucina(IL)-1 β e IL-6. Esta naftoquinona, na dose de 0,15 mg/Kg por via oral, reverteu a formação do edema induzido pela Cg, a hiperalgesia mecânica induzida pela prostaglandina E₂ (PGE₂), mas não pela dopamina. Sua ação antinociceptiva não foi bloqueada pelo pré-tratamento dos animais com glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis à adenosina trifosfato (ATP). O composto, também não reverteu a hiperalgesia mecânica induzida pela administração do análogo permeável do ATP, o dibutilil monofosfato cíclico de adenosina (dbAMPc). O CI inibiu a febre e o aumento da concentração plasmática de TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzidos pela administração de LPS. O tratamento local com o composto isolado nas doses de 150 e 500 pg/pata reverteu a formação do edema. Estes dados sugerem que o extrato bruto tem importante atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antipirética e que, ao menos em parte, estas atividades estão relacionadas à presença do CI.

ABSTRACT

This study evaluated the anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic properties of the crude extract from *Sinningia canescens*, its fractions and from the naphthoquinone 6-methoxy-7-hydroxy- α -dunnione isolated from the hexane fraction in male Swiss mice. The crude extract, at doses of 30 and 100 mg/kg orally reduced the paw edema induced by carrageenan (Uchakov *et al.*) in 66% and 68%, respectively, in the fourth hour, the writhing induced by acetic acid in 60.3% and 74.8%, the second phase of nociception induced by formalin in 36.8% and 38.4% and the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan in 88.2%. Lower doses had no effect. The crude extract at 30 mg/kg also abolished the fever induced by lipopolysaccharide (LPS) without affecting normal body temperature of the animals. The crude extract at doses of 10 and 30 mg/kg inhibited the increase in plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) concentration induced by LPS in 53% and 66%, respectively. The crude extract did not alter the motor performance assessed by rota-rod test at the lowest antinociceptive dose tested 30 mg/kg, and did not increase the latency in hot plate test in the same dose. The dichloromethane and hexane fractions at the doses of 2.5 and 2 mg/kg orally, respectively, inhibited the formation of paw edema and hyperalgesia induced by Cg and the fever induced by LPS. The butanol and ethyl acetate fractions had no effect on any of these tests at doses based on the yield of each fraction. The isolated compound, a naphthoquinone found in dichloromethane and hexane fractions, 6-methoxy-7-hydroxy- α -dunnione was evaluated for its anti-edematogenic, antinociceptive and antipyretic effects in addition to its effect on the concentrations TNF- α , interleukin (IL) -1 β and IL-6 in the plasma. This naphthoquinone at 0.15 mg/kg orally reduced the edema formation induced by Cg, the mechanical hyperalgesia induced by prostaglandin E₂ (PGE₂), but not by dopamine. Its antinociceptive action was not blocked by pretreatment of the animals with glibenclamide, a selective blocker of ATP-sensitive potassium channels. The compound also did not change the mechanical hyperalgesia induced by the permeable ATP analog, dibutiryl cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP). The 6-methoxy-7-hydroxy- α -dunnione inhibited the febrile response and the increase in plasma concentration of TNF- α , IL-1 β and IL-6 induced by LPS. Local treatment with the compound at doses of 150 and 500 pg reduced the paw edema induced by Cg. These data suggest that the crude extract has an important anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effect and these activities are, at least in part, related to the presence of 6-methoxy-7-hydroxy- α -dunnione

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Cascata de citocinas induzidas pela carragenina.....	17
FIGURA 2: Fracionamento do extrato bruto e estrutura química do composto isolado.....	24
FIGURA 3: Perfil no CLAE-DAD das frações DCM e HEX.....	25
FIGURA 4: Efeito do extrato bruto sobre edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	37
FIGURA 5: Efeito do extrato bruto sobre número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	39
FIGURA 6: Efeito do extrato bruto sobre nocicepção induzida pela formalina em camundongos.....	41
FIGURA 7: Efeito do extrato bruto sobre hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina em camundongos.....	43
FIGURA 8: Efeito do extrato bruto sobre nocicepção térmica em camundongos.....	45
FIGURA 9: Efeito do extrato bruto sobre desempenho motor dos camundongos.....	47
FIGURA 10: Efeito da administração do extrato bruto sobre resposta febril induzida pelo lipopolissacarídeo em camundongos.....	49
FIGURA 11: Efeito da administração do extrato bruto sobre aumento da concentração plasmática de TNF- α induzida pelo lipopolissacarídeo em camundongos.....	50
FIGURA 12: Efeito das frações sobre edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.....	52
FIGURA 13: Efeito das frações sobre hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina em camundongos.....	53
FIGURA 14: Efeito da administração das frações diclorometano e hexano sobre febre induzida pelo lipopolissacarídeo em camundongos.....	55

FIGURA 15: Efeito do composto isolado sobre edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	57
FIGURA 16: Efeito do tratamento dos animais com o composto isolado sobre hiperalgesia mecânica induzida pela dopamina, prostaglandina E ₂ e pelo db AMP _c em camundongos.....	59
FIGURA 17: Efeito do pré-tratamento com glibenclamida sobre efeito antinociceptivo do composto isolado.....	61
FIGURA 18: Efeito da administração do composto isolado sobre a resposta febril induzida pelo lipopolissacarídeo em camundongos.....	63
FIGURA 19: Efeito da administração composto isolado sobre o aumento da concentração plasmática de TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzida pelo lipopolissacarídeo em camundongos.....	64
FIGURA 20: Efeito do tratamento local com o composto isolado sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AcEt	Fração Acetato de Etila
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
AMP _c	Adenosina Monofostato Cíclico
APO/HA	Área pré-óptica do Hipotálamo Anterior
AS	Aminas simpatomiméticas
ATP	Adenosina Trifostato
BUT	Fração butanólica
BK	Bradicinina
CI	Composto Isolado
Cg	Carragenina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX	Ciclooxigenase
dbAMP _c	Dibutiril Adenosina Monofosfato Cíclico
DCM	Fração Diclorometano
EB	Extrato Bruto
HEX	Fração hexano
ICV	Intracerebroventricular
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
I.pL	Intraplantar
LPS	Lipopolissacarídeo
Na ⁺ _v	Canal de sódio voltagem-dependente
PG	Prostaglandina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TRP	Receptor de Potencial Transitório

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Edema	16
1.2 Dor e nocicepção	19
1.3 Resposta febril	23
1.4 O tratamento da inflamação e da febre e a pesquisa de novos fármacos	25
1.5 O gênero <i>Sinningia</i> e a <i>Sinningia canescens</i>	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Animais	31
3.2 Material botânico e preparação do extrato, frações e isolamento do composto ativo	31
3.3 Assepsia e esterilização	35
3.4 Drogas e reagentes	35
3.4.1 Drogas	35
3.4.2. Diluição e vias de administração	36
3.5 Edema de pata induzido por carragenina	36
3.6 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	37
3.7 Nocicepção induzida pela formalina	37
3.8 Hiperalgisia mecânica induzida por carragenina	38
3.9 Teste da placa aquecida	39
3.10 Efeito sobre o desempenho motor (rota-rod)	40
3.11 Febre induzida por lipopolissacarídeo	40
3.12 Coleta de sangue para dosagem de citocinas	41
3.13 Dosagem de citocinas	42
3.13.1 Dosagem de TNF- α	42
3.13.2 Dosagem de IL-1 β e IL-6	42
3.14 Análise estatística	43
4. RESULTADOS	44
4.1 Efeito do extrato bruto sobre o edema de pata induzido por carragenina	44

4.2 Efeito do extrato bruto sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	46
4.3 Efeito do extrato bruto sobre a nocicepção induzida pela formalina	48
4.4 Efeito do extrato bruto sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina.....	50
4.5 Efeito do extrato bruto sobre a nocicepção térmica	52
4.6 Efeito do extrato bruto sobre o desempenho motor	54
4.7 Efeito do extrato bruto sobre a resposta febril e sobre o aumento da concentração plasmática de TNF- α induzido pela administração de LPS.....	56
4.8 Efeito das frações sobre o edema de pata e sobre a hiperalgesia mecânica induzidos pela carragenina.	59
4.9 Efeito das frações DCM e HEX sobre a febre induzida pela administração de LPS.	62
4.10. Efeito da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona sobre o edema de pata induzido pela carragenina.	64
4.11 Efeito da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela dopamina, prostaglandina E ₂ e dibutilil AMP _c	66
4.12 Efeito do bloqueio de canais de potássio sensíveis ao ATP sobre o efeito antinociceptivo do composto isolado	68
4.13 Efeito do composto isolado sobre a febre e sobre o aumento da concentração plasmática de citocinas induzido por LPS.	70
4.14 Efeito do tratamento local com o composto isolado sobre o edema de pata induzido pela carragenina.	73
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS	93

1. INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória, apesar de relatos anteriores, foi pela primeira vez coerentemente caracterizada por *Aulus Cornelius Celsus* (25 A.C-50 D.C.) que descreveu os sinais inflamatórios clássicos: dor, calor, rubor e formação de edema (Pikoulis *et al.*, 2004). A inflamação pode ser facilmente descrita como a reação do organismo a um dano tecidual (Rocha e Silva, 1978). Sabe-se, desde então, que este dano, como uma lesão ocasionada por agentes físicos, químicos ou uma infecção, promove um arsenal de mudanças funcionais no organismo, chamada inflamação.

Embora algumas diferenças possam existir, as respostas ao dano não são essencialmente decorrentes das características do agente causador, mas sim, uma resposta das células do organismo lesado no sentido de restringir, diluir ou eliminar o agente agressor.

A partir da metade do século XX a resposta inflamatória passou a ser vista de fato como uma resposta celular. Entretanto, é importante ressaltar que esta resposta nem sempre está ligada a um agente externo, mas que poder ser desencadeada por moléculas sinalizadoras pró-inflamatórias liberadas em resposta a agentes internos, como a deposição de complexos antígeno-anticorpo em uma articulação durante uma artrite reumatoide (Joensuu *et al.*, 2015).

Deste modo, esta resposta se dá em fases, sendo que se inicia pela ativação de plaquetas e das próprias células endoteliais, seguido do recrutamento e ativação de leucócitos que então iniciará a reparação do tecido e eliminação do agente agressor (Pober *et al.*, 2007).

Este processo pode, entretanto, ser disparado e modulado por eventos que acontecem no exterior do vaso pela ação de agentes primários da resposta, como a degranulação de mastócitos (Soter, 1980; Souza *et al.*, 1988), sem depender da ativação plaquetária por exemplo.

Assim, após a eliminação do agente agressor, a resposta inflamatória deve evoluir para um processo de resolução e reparação do tecido lesado. Entretanto, a resolução da inflamação nem sempre ocorre, em geral pela persistência do estímulo inflamatório, tornando a resposta exacerbada e sem um aparente benefício, o que pode, por exemplo, causar diversas doenças como a artrite reumatóide ou psoríase (Romano *et al.*, 2015).

Esta complexa resposta pode inclusive tornar-se sistêmica, sendo desde 1991, designada como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Bone, 2009) e que se baseia em anormalidades clínicas e laboratoriais, como febre e leucopenia, entre outros (Dellinger, 2008).

Nos capítulos subsequentes descreveremos sucintamente alguns fenômenos da resposta inflamatória, particularmente a formação de edema e a dor, bem como da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, como a febre, pois estes fenômenos serão avaliados neste trabalho.

1.1. Edema

O edema decorre do grande acúmulo de fluido na matriz extracelular no espaço intersticial (Amelang *et al.*, 1981). A formação do edema é atribuída à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores inflamatórios, que aumentam o fluxo de plasma e levam ao acúmulo de exsudato no tecido. O início da resposta envolve mudanças hemodinâmicas, sendo este o primeiro evento inflamatório (Wilhelm *et al.*, 1957). Os vasos no local inflamado tornam-se dilatados, e como consequência desta vasodilatação há aumento do fluxo de sangue no tecido local. Muitos dos mediadores inflamatórios agem de maneira indireta, estimulando as células endoteliais a liberarem mediadores que então irão relaxar o músculo liso vascular (Pober *et al.*, 2007).

Uma das primeiras alterações que se observa, logo após a algum trauma de qualquer tecido são o rubor e o calor local decorrentes da vasodilatação, que por sua vez deriva da liberação de mediadores como prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂), histamina, serotonina (5-HT), bradicinina, óxido nítrico (NO)

entre outros. A histamina, liberada principalmente de mastócitos (Oschatz, 2011), a bradicinina formada no plasma através do sistema calicreína-cininas (Maling, 1974), a serotonina liberada pelos mastócitos e plaquetas e a substância P (Burch, 1990) promovem vasodilatação por induzirem a liberação de óxido nítrico (NO).

Assim, estes mediadores produzidos durante a inflamação, produzem conforme mencionado vasodilatação de maneira indireta, ligando-se a seus receptores presentes nas células endoteliais, e induzindo o aumento transitório da concentração de cálcio citosólico, que produzirá então os mediadores finais responsáveis pela vasodilatação (Luckhoff, 1992). O NO é gerado a partir do oxigênio molecular e a L-arginina, reação esta catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Diversas isoformas desta enzima já foram isoladas e purificadas: as enzimas ditas constitutivas (cNOS) que estão presentes em condições fisiológicas normais, como a NOS₃ ou endotelial e a NOS₁ ou neuronal, e as induzidas (iNOS ou NOS₂) que são expressas em resposta à estímulos patológicos, como o LPS (lipopolissacarídeo de bactérias Gram negativas) e/ou por citocinas (Moncada *et al.*, 1991; Sautebin *et al.*, 1995). O cálcio também se complexa com a proteína adaptadora calmodulina, ativando a NOS₃ (Sharma, 2007). O óxido nítrico é um potente vasodilatador, aumentando o edema por modificar completamente o fluxo sanguíneo local (Moncada *et al.*, 1991) e por aumentar a permeabilidade vascular

A ativação da fosfolipase A₂ citosólica também é dependente de cálcio. Esta enzima é responsável por clivar os lipídeos da membrana celular que serão rapidamente convertidos prostaglandinas. As PGs também contribuem para o aumento do fluxo sanguíneo local promovendo vasodilatação. A síntese de PGE₂ e PGI₂ inicia-se com o metabolismo do ácido araquidônico pelas ciclooxigenases (COX), que existem sob duas isoformas. Ao contrário da COX-1 que é expressa constitutivamente nas células, a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios como lipopolissacarídeo de parede celular de bactérias Gram negativa (LPS) e por citocinas como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Feng *et al.*, 1995). Seibert e cols demonstraram que as PGs que participam da formação do edema são geradas principalmente por COX-2 (Seibert *et al.*, 1994)

Portanto, a amplificação desta resposta se dá principalmente pela ação das citocinas. A ação destas citocinas induz então a alteração na funcionalidade celular, estimulando a síntese de diferentes proteínas, gerando uma resposta inflamatória mais tardia e mais prolongada, diferente dos mediadores citados anteriormente, que induzem uma resposta rápida, sem envolver síntese proteica (Pober *et al.*, 2007). Os macrófagos são a principal fonte destas citocinas e são, portanto, essenciais para esta resposta (Souza, 1988). O reconhecimento pelos macrófagos de padrões moleculares associados ao dano (DAMP), ou a patógenos (PAMP), induz via receptores NOD (NLR) ou Toll (TLR) respectivamente, a produção de citocinas como IL-1 β e TNF- α .

Concomitantemente à vasodilatação, ocorre um aumento da permeabilidade venular, já que alguns destes mediadores como a histamina, a bradicinina e a substância P também geram o aumento nos espaços intercelulares na porção venular, resultando no aumento da permeabilidade da barreira endotelial. Estudos estruturais na pele de ratos têm demonstrado que o aumento da permeabilidade vascular é uma consequência da contração dos filamentos de actina-miosina endoteliais nas vênulas pós-capilares, o qual leva a formação de poros intercelulares (Becker e Nachman, 1973(Marks, 1977). A fosforilação da miosina de cadeia leve inicia a contração dos filamentos de actina que estão associados às junções intercelulares, separando as células e aumentando a permeabilidade do endotélio, permitindo assim o extravasamento de proteínas e formando o edema por acumular principalmente água na matriz extra-celular (Pober, 2007). Proteínas plasmáticas maiores do que 135 Å extravasam do plasma para o tecido conectivo através destes poros, os quais estima-se terem diâmetro de 12 nm (Keahey *et al.*, 1989). A presença de proteínas plasmáticas no tecido conectivo altera o gradiente coloidosmótico normal, e o efluxo de fluido aumenta rapidamente, resultando em edema (Gallin *et al.*, 1992).

Este aumento na permeabilidade venular é causado principalmente por histamina (mastócitos), bradicinina (do sistema cininas-caliceína) formada no plasma e que atua em receptores B₂ e B₁, serotonina (plaquetas) e leucotrienos (Jancar *et al.*, 1991; Ahluwalia, 1998). Outros mediadores também contribuem no

aumento da permeabilidade vascular como o complemento C5a (Williams, 1983) e os leucotrienos C₄, D₄, E₄ (Samuelsson, 1983) e B₄ (Bray, 1982). Citocinas como IL-1 β e TNF- α contribuem substancialmente para o aumento da permeabilidade vascular, particularmente por induzirem a síntese de receptores B1 de bradicicina, potenciando assim o edema inflamatório (Campos *et al.*, 1999)

1.2 Dor e nocicepção

A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório, sendo definida como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tais lesões” (Loeser e Treede, 2008). Deste modo, embora a dor seja uma experiência sensorial que depende da ativação de neurônios e chegada do sinal ao sistema nervoso central, sua percepção pode ser modulada por emoções, condições psicológicas e pelo histórico de cada indivíduo.

Já a nocicepção é a resposta à ativação de subpopulações de neurônios sensoriais aferentes específicos, que transmitem esta sensação à medula espinhal para que seja decodificada e interpretada, em um nível supra-espinhal (Basbaum, 2009).

Estes neurônios sensoriais possuem terminações livres capazes de codificar e transmitir um estímulo nocivo sendo então chamados de nociceptores (Loeser e Treede, 2008). Os nociceptores são em geral terminações sensoriais livres do tipo C e A δ de alto limiar. Anatomicamente, as fibras aferentes nociceptivas que inervam a cabeça possuem seus corpos celulares no glânglio trigeminal, ao passo que as fibras que inervam o restante do corpo possuem seus corpos celulares no glânglio da raiz dorsal (Campbell e Meyer, 2006). Estas fibras podem também ser diferenciadas por critérios funcionais. O maior número de nociceptores está associado a axônios não mielinizados também chamados de fibras C, realizando, portanto, uma transmissão mais lenta e difusa do estímulo nocivo. Estes nociceptores são polimodais, identificando estímulos mecânicos, térmicos ou químicos.

Associado às fibras pouco mielinizadas está a segunda maior população de nociceptores, ou fibras A δ . Estas fibras tem por característica a condução mais veloz e localizada do impulso (Basbaum, 2000). Corpos celulares de maior diâmetro dão origem a fibras sensoriais primárias mielinizadas e de rápida condução. Estas fibras A β , de forma geral, detectam estímulos não dolorosos, não sendo então, relevantes para nocicepção (Djoughri et al, 1998).

As fibras aferentes dirigem-se à medula espinhal sem fazer nenhuma conexão. Os corpos celulares destes neurônios localizados tanto no gânglio da raiz dorsal quanto no gânglio trigeminal adentram a medula espinhal pela raiz dorsal, chegando na substância cinzenta da medula espinhal. Suas projeções são encontradas preferencialmente nas camadas mais superficiais, divisão esta baseada na anatomia da substância cinzenta que é dividida em dez lâminas, ou lâminas de Rexed (Rexed, 1952).

A resposta das fibras do tipo C depende de características neuroquímicas, o que subdivide estas fibras em dois grupos: fibras peptidérgicas e fibras não-peptidérgicas. Os principais neurotransmissores das fibras peptidérgicas são a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) além de aminoácidos excitatórios como o glutamato e o aspartato (Millan, 1999). Estas fibras peptidérgicas projetam-se principalmente para a lâmina I do corno dorsal da medula. As fibras não-peptidérgicas não produzem substância P e podem ser classificadas por ligarem-se ao carboidrato α -D-galactosil lecitina IB4, além de expressarem receptores purinérgicos excitatórios para ATP (Basbaum, 2009; Millan, 1999). As fibras não peptidérgicas se projetam mais densamente para a lâmina II do corno dorsal da medula.

Após a conexão sináptica entre os neurônios nociceptivo e os neurônios de projeção, há a transmissão da informação nociceptiva para as regiões supra-espinhais, como a área parabrancial lateral e para o tálamo, que resulta na interpretação e consciência da dor (Zeilhofer *et al*, 2012).

A ação dos mediadores produzidos na resposta inflamatória pode resultar tanto na ativação quanto na sensibilização dos nociceptores. Os mediadores inflamatórios, sintetizados e liberados no local da inflamação por vários tipos

celulares como células imunes residentes, plaquetas e também pelas terminações nervosas, (Loyd, 2015) contribuem para o desenvolvimento e manutenção da dor, tanto estimulando diretamente o nociceptor quanto promovendo a sensibilização para outros estímulos (Cervero et al, 2009).

Alguns mediadores como íons potássio, íons hidrogênio e ATP, liberados da célula lesada, ou mediadores como a bradicinina e substância P, causam estimulação direta do nociceptor (Basbaum, 2009).

No entanto, a sensibilização de nociceptores é a principal característica da dor inflamatória e resulta em dois diferentes processos: a hiperalgesia e a alodinia. Este incremento na responsividade do sistema nociceptivo aos estímulos caracteriza a hiperalgesia (Loeser e Treede, 2008). Já a alodinia ocorre quando estímulos não dolorosos passam a ser interpretados como dor (Loeser e Treede, 2008)

A sensibilização pode ocorrer tanto no sistema nervoso central (sensibilização central) como na periferia (sensibilização periférica) (Basbaum, 2009). A sensibilização dos nociceptores ocorre principalmente pela ação de prostaglandinas (England, 1996) e aminas simpatomiméticas (Khasar, 1999). A capacidade de sensibilização destes mediadores já foi demonstrada em humanos e outros animais usando tanto modelos comportamentais quanto técnicas eletrofisiológicas (Hannington-Kiff, 1986 ;Duarte, 1988).

O aumento de Ca^{2+} intracelular em diversos tipos celulares seja por ação de mediadores inflamatórios (bradicinina, substância P, serotonina) seja pela ação de produtos da lesão celular (ATP, íons H^+ , etc) permite a liberação de lipídeos da membrana, principalmente ácido araquidônico, pela ação da fosfolipase A_2 (Svensson e Yaksh, 2002). Como mencionado anteriormente, ácido araquidônico é o precursor de prostaglandinas e sua metabolização durante a resposta inflamatória depende da COX, particularmente COX-2 é induzida após lesão ou inflamação (Willingale, 1997). Dentre os principais fatores responsáveis pela indução da COX-2 durante um estímulo inflamatório nociceptivo estão as citocinas, como o TNF- α e a IL-1 β (Cunha, 2005). Em camundongos, a carragenina ativa a síntese/liberação de TNF- α que estimula a produção de IL-1 β .

A IL-1 β induz a síntese de COX-2 que é a responsável pela síntese de prostaglandinas (Fig. 1).

Em contraponto ao já bem conhecido mecanismo de indução de prostaglandinas, a liberação de aminas simpáticas como a norepinefrina e a dopamina é menos conhecida (Duarte *et al.*, 1988). Em camundongos, é conhecido que a carragenina também induz a síntese e liberação de quimiocina derivada de queratinócitos (KC), que além de atuar pelo mesmo mecanismo do TNF- α , promove a liberação de aminas simpáticas que são capazes de também sensibilizar o nociceptor (Cunha *et al.*, 2005)

Uma cascata pré-definida de citocinas e quimiocinas precede a liberação de prostaglandina e aminas simpáticas (Ferreira *et al.*, 1988; ;Lorenzetti, 2002 ;Cunha *et al.*, 1992 ;Cunha *et al.*, 2005 ;Poole, 1999).

A figura 1 apresenta esta cascata de mediadores.

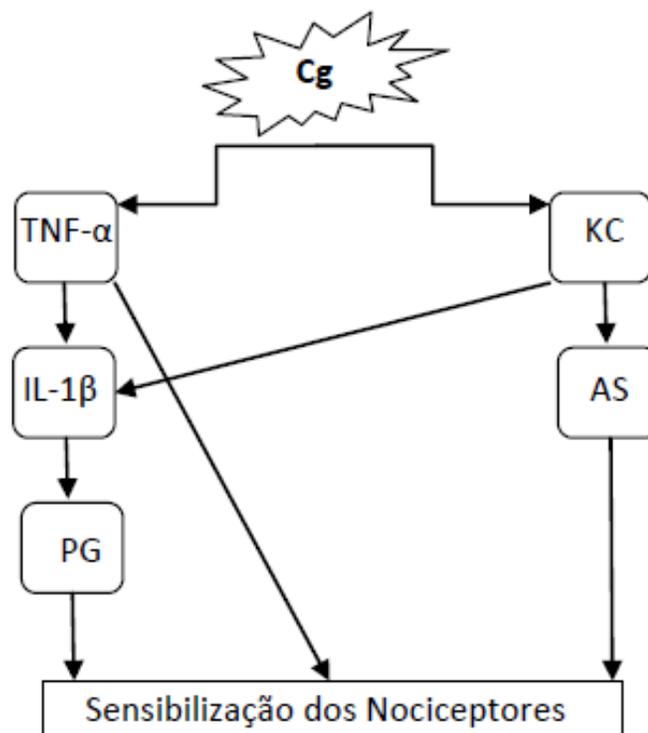


FIGURA 1: Cascata de citocinas induzida pela carragenina em camundongos: TNF- α , IL-1 β e KC, que desencadeiam a liberação de prostaglandina (PG) e aminas simpáticas (AS).
 FONTE: Modificado de Cunha *et al.* 2005 (Cunha, 2005)

Sabe-se também, que em camundongos, a sensibilização dos nociceptores mediada pela bradicinina, produz prostaglandinas e aminas simpatomiméticas, independentemente da produção de citocinas (Poole, 1999). Mecanismos parecidos, mas não idênticos, também já foram descritos em ratos. Em ambas as espécies a liberação de prostanóides é induzida pela IL-1 β . O TNF- α , entretanto, estimula as duas vias em ratos e somente a de prostaglandina em camundongos. O CINC-1 estimula somente a produção de aminas simpáticas em ratos e, conforme a figura 1, ambas as vias em camundongos.

Estes mediadores, agindo preferencialmente em receptores metabotrópicos localizados na membrana neuronal, induzem a formação de segundos mensageiros como AMP cíclico, proteína quinase A e proteína quinase C (Taiwo, 1991 ;Gordon, 2004 ;Aley, 1999 ;Ferreira, 1980 ;Ferreira, 1979). A ativação destas quinases leva à subsequente fosforilação de canais de sódio voltagem dependente, particularmente Nav 1.8 (Baker, 2001 ;Gold, 1998;Parada, 2003), Nav 1.9 (Priest, 2005) responsáveis por aumentar a excitabilidade da membrana do neurônio.

1.3 Resposta febril

A temperatura tem papel crítico na homeostase já que as reações bioquímicas envolvidas no metabolismo são exponencialmente influenciadas pela temperatura corporal (Gillooly *et al.*, 2001). Apesar de ser crítica a manutenção de uma temperatura estável, em algumas condições clínicas ocorre um aumento na temperatura corporal considerada normal, levando à resposta febril.

A febre é definida então como o aumento controlado da temperatura corporal decorrente de uma alteração no controle térmico exercido pelo hipotálamo, particularmente na área pré-óptica do hipotálamo anterior, e é um dos sinais clínicos da resposta inflamatória sistêmica (Dinarello, 1996). Quando a febre inicia-se, a temperatura corporal está inferior à definida como referência. Assim,

mecanismos e geração e conservação de calor são ativados, como tremor, mudanças comportamentais como procurar um ambiente mais quente e vasoconstrição (Cannon, 2013).

Um modelo clássico e indução da resposta febril é a administração de lipopolissacarídeo (LPS), proveniente da membrana celular de bactérias gram-negativas, em animais de laboratório. Este modelo mimetiza naturalmente o que ocorre nos processos infecciosos por este tipo de bactéria.

Quando monócitos e macrófagos entram em contato com patógenos, produtos de lesão tecidual ou toxinas como o LPS (Fraga *et al.*, 2015; Cannon, 2013; Chunhakan, 2015; Conti, 2004; Hamzic, 2013), estas células produzem citocinas. Entre estas citocinas estão o TNF- α (Long *et al.*, 1990), IL-1 β (Dinarello, 1984), e IL-6 (Helle *et al.*, 1988), consideradas pirogênios endógenos justamente pela sua influência no ponto de regulação da temperatura no hipotálamo. Geralmente, altos níveis destas citocinas pró-inflamatórias são observados na circulação sanguínea na fase aguda da reação inflamatória relacionadas à indução da resposta febril (Engelhardt *et al.*, 1995).

Uma vez liberadas por estas células, as citocinas interagem com as células do órgão vascular da lâmina terminal induzindo a síntese de prostaglandinas (Netea, 2000). O órgão vascular da lamina terminal apresenta-se isento de barreira hematoencefálica e está próxima da área pré-óptica do hipotálamo anterior (Blatteis *et al.*, 1983; Stitt, 1989).

Existem pelo menos quatro subtipos de receptores de prostaglandina E₂, sendo EP₃ o mais importante para a febre, seguido do EP₁ (Romanovsky *et al.*, 2005).

A ligação da PGE₂ ao seu receptor ativa uma proteína G que inibe a atividade da enzima adenilato ciclase, reduzindo os níveis de adenosina monofosfato cíclico, AMP_C. O AMP_C aumenta a sensibilidade térmica dos neurônios sensíveis ao calor, levando, portanto, ao aumento do ponto de regulação da temperatura corporal no hipotálamo anterior, mais especificamente na área pré-óptica.

Além das prostaglandinas, outros mediadores centrais podem estar envolvidos na resposta febril como o fator liberador de corticotrofina (Zampronio *et*

al., 2000), endotelina-1 (Fabricio *et al.*, 1998), opióides endógenos (Fraga *et al.*, 2009) e substância P (Reis *et al.*, 2011) entre outros.

1.4 O tratamento da inflamação e da febre e a pesquisa de novos fármacos

A reação inflamatória é um mecanismo de proteção do organismo, mas em certas circunstâncias, essa resposta pode ser dirigida de forma inadequada podendo então a própria resposta produzir danos. Nestas condições pode ser necessária a utilização de drogas anti-inflamatórias. Existem basicamente duas classes de drogas anti-inflamatórias, os glicocorticóides e os anti-inflamatórios não-esteroidais (Baker *et al.* 1983), utilizados clinicamente para o controle da inflamação.

Os glicocorticóides modulam importantes componentes da resposta de defesa do hospedeiro por meio de seus efeitos imunossupressores, anti-inflamatórios e antipiréticos. Estes hormônios inibem a transcrição de várias citocinas importantes para a resposta imune e/ou inflamatória, como IL-1 β , IL-6, e o TNF- α (Barnes e Adcock, 1993).

O controle da síntese/liberação de citocinas exercido pelos glicocorticóides é bem ilustrado em camundongos adrenalectomizados, os quais apresentam concentrações plasmáticas de TNF- α mais elevadas e maior expressão de RNAm para IL-1 β , IL-6 e TNF- α na pituitária e hipotálamo quando comparados a animais falso-operados (Zuckerman *et al.*, 1989; Goujon, 1996). Ainda, ratos adrenalectomizados estimulados com endotoxina apresentam maiores concentrações de IL-6 e PGE₂ no fluido cérebroespinal, bem como IL-6 no plasma, quando comparados a animais falso operados (Coelho *et al.*, 1995).

A produção de eicosanóides, é controlada em diferentes níveis por estes hormônios. Uma das formas pela qual os glicocorticóides inibem a produção de prostaglandinas é por meio da indução da síntese de lipocortinas, que por sua vez atuam inibindo a fosfolipase A₂, a enzima que converte fosfolipídeos de membrana em ácido araquidônico (Flower e Rothwell, 1994). Além disto, os glicocorticóides também inibem a expressão gênica desta enzima (Nakano e Arita, 1990). O ácido araquidônico é o

substrato da enzima ciclooxigenase, que cataliza a síntese de PGH_2 , o precursor comum das prostaglandinas, tromboxanas e prostaciclina. A síntese da COX-2 cuja expressão é induzida por estímulos inflamatórios, é inibida por glicocorticóides (Goppelt-Struebe *et al.*, 1989; Masferrer, 1992; O'Banion, 1992; Masferrer, 1994). Conseqüentemente possuem uma ação anti-inflamatória reduzindo o edema, uma ação analgésica através da redução das citocinas e das prostaglandinas e uma ação antipirética através da redução de PGE_2 e pirogênios endógenos responsáveis pela elevação do ponto de ajuste hipotalâmico para o controle da temperatura. No entanto, uso crônico de glicocorticoides está associado à alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, síndrome de Cushing e desequilíbrio eletrolítico (Romanholi, 2007)

Da mesma maneira, os AINES parecem exercer suas atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas por inibirem a síntese de prostaglandinas (revisado por Vane e Botting, 1998). Os AINES atuam na inibição da COX e conseqüentemente da síntese das PGs. Vários efeitos colaterais são associados ao uso de AINES, como ulceração e intolerância gástrica, inibição da função plaquetária, prolongamento da gestação e alterações renais (Fung, 1999). Mesmo os inibidores seletivos da COX-2, ou coxibes, que apresentam menor incidência de lesão no trato gastrointestinal, levam a um risco aumentado de infarto agudo do miocárdio e morte (Nielsen, 2006).

Além destas duas classes de drogas utilizadas essencialmente em condições inflamatórias, existem ainda muitas outras classes de drogas que podem ser utilizadas como analgésicas (mas não antiinflamatórias) como, por exemplo, os opióides. Estas drogas possuem sua ação analgésica por ativarem a via descendente inibitória da dor, particularmente através de ativação de receptores do tipo μ (Kline e Wiley, 2008).

Outra estratégia terapêutica que tem sido utilizada nos últimos anos é o uso de imunobiológicos (anticorpos e proteínas de fusão). Foi demonstrado que o bloqueio de uma única citocina, como o TNF- α , tem grande valor terapêutico no tratamento da artrite reumatoide (Feldmann, 2001). O tratamento com

imunobiológicos possui também suas limitações, principalmente farmacocinéticas e devido ao seu alto custo (Fantini, 2003).

A pesquisa por novas drogas usando plantas é, portanto relevante, já que o desenvolvimento de novas moléculas mais efetivas para a terapia dos sinais e sintomas da inflamação ainda é um desafio para indústria farmacêutica; além disso, as plantas medicinais fornecem fármacos de difícil síntese, como alguns alcalóides e glicosídeos, ou protótipos para síntese de fármacos mais eficazes (Turolla, 2006).

1.5 O gênero *Sinningia* e a *Sinningia canescens*.

A família de plantas *Gesneriaceae* compreende 135 gêneros e cerca de 3000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que o gênero *Sinningia* compreende atualmente 71 espécies, das quais cerca de 69 ocorrem em território brasileiro. A *Sinningia canescens* (Martius) Wiehler é encontrada principalmente na região sul e sudeste do Brasil, sendo os estados do Paraná e São Paulo os que abrigam naturalmente esta espécie. Esta planta tuberosa e perene tem por característica folhas de textura aveludada e cor prateada, e flores tubulares de cor alaranjada.

Antraquinonas, naftoquinonas, cromenos e derivados do etilciclohexano foram isolados do gênero *Sinningia* recentemente (Verdan, 2012; Kassuya *et al.*, 2009; Verdan, 2009; Kassuya, 2009; Verdan *et al.*, 2014). Alguns destes compostos podem agir como potentes analgésicos e/ou anti-inflamatórios.

Apesar do uso quase que exclusivamente ornamental destas plantas, estudos anteriores do nosso grupo que demonstraram as atividades biológicas destes compostos (Barbosa, 2013; Mori, 2011; Souza, 2015; Mori, 2011). Na *S. allogophylla*, o composto isolado 8-metoxi-lapachenol, mostrou importante atividade antinociceptiva, revertendo a hiperalgesia causada por diversos mediadores (Barbosa *et al.*, 2013). Recentemente, a naftoquinona agregatina D, isolada da *S. aggregata*, reverteu a hiperalgesia causada por diversos mediadores e também a causada pela prostaglandina E₂ e pela dopamina (Souza *et al.*, 2015).

Estes estudos motivaram a continuidade da pesquisa com este gênero de plantas por compostos com propriedades anti-inflamatórias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antiedematogênico, antinociceptivo e antipirético do extrato bruto obtido dos tubérculos de *Sinningia canescens* (Martius) Wiehler, suas frações e do composto isolado 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade anti-inflamatória (antiedematogênica), antinociceptiva e antipirética do extrato bruto utilizando os modelos de edema de pata induzida por carragenina, contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, nocicepção induzida por formalina, hiperalgesia mecânica induzida por carragenina e febre induzida por LPS.
2. Avaliar o efeito do extrato bruto sobre a nocicepção térmica (calor) e sobre o desempenho motor.
3. Avaliar o efeito do extrato bruto sobre a concentração plasmática de TNF- α no plasma de animais estimulados com LPS.
4. Avaliar o efeito das diferentes frações obtidas do extrato bruto sobre o edema de pata e hiperalgesia mecânica induzidos por carragenina e sobre a febre induzida por LPS.
5. Avaliar o efeito do composto isolado 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona sobre o edema de pata induzido por carragenina, hiperalgesia mecânica induzida por PGE₂, dopamina e dibutiril AMP_C e sobre a febre induzida pelo LPS.
6. Avaliar o efeito da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona sobre a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no plasma de animais estimulados com LPS.
7. Avaliar o efeito do tratamento local com 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona no edema de pata induzido pela carragenina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Nos experimentos foram utilizados camundongos machos da variedade *Swiss*, com peso entre 30-40 g provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em ambiente em temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade (60-80%) controladas, em ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h) e com livre acesso à ração e a água. Posteriormente, os animais foram transferidos para salas de aclimação do laboratório de Inflamação, dor e febre do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná sob as mesmas condições pelo menos 24 h antes dos experimentos. 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 a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos - DBCA e de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR, protocolo n° 745).

3.2 Material botânico e preparação do extrato, frações e isolamento do composto ativo.

Foram coletados tubérculos de *Sinningia canescens* (Martius) Wiehler em Ponta Grossa, Paraná, Brasil ($25^{\circ}12'10''$; S; $49^{\circ}56'38''$; W) em maio de 2010. A planta foi identificada pelo Dr. Armando C. Cervi e um *voucher* foi depositado no Museu Botânico Municipal (#MBM 363740) de Curitiba.

O procedimento detalhado de obtenção das frações e de isolamento e identificação da naftoquinona 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona foi descrito anteriormente pelo grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Maria Élide Alves Stefanello, do

Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (Verdan *et al.*, 2014).

Resumidamente, o material botânico seco e moído (tubérculos, 223g) foi extraído à temperatura ambiente com etanol. Foram realizadas três extrações sucessivas e então o volume final de solvente das três extrações foi removido em evaporador rotativo, rendendo 25,1 g.

Parte do extrato foi submetido à partição com hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcEt) e butanol (BUT) obtendo-se quatro frações, com os respectivos rendimentos: 5,82%, 7,25%, 30,76%, 40,63% (Fig. 2)

O fracionamento cromatográfico da fração HEX 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 H, RMN de carbono 13, espectros de massa e comparação com dados da literatura. O composto majoritário das frações HEX e DCM foi a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona cuja estrutura química é apresentada na figura 2. A figura 3 apresenta o perfil das frações DCM e HEX, na cromatografia líquida de alta eficiência, mostrando a presença da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona em ambas as frações.



223g (tubérculos secos e moídos)
 EXTRAÇÃO COM ETANOL (1000 ml/100g, 3x)
 Redissolvido em etanol (9:1)

↓	↓	↓	↓
BUT (40,63%)	AcEt. (30,76%)	DCM (7,25%)	HEX (5,82%)

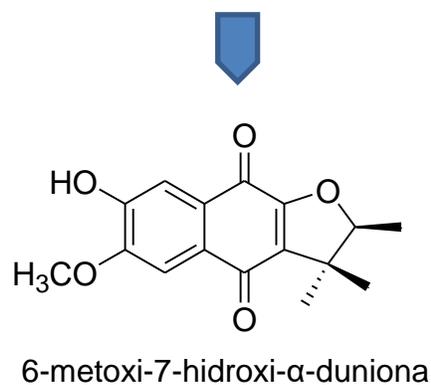


Figura 2: Fracionamento do extrato bruto. Os bulbos secos de *S. canenses* foram submetidos à extração com etanol e o material resultante dissolvido em Etanol:Água e em seguida fracionado. Nas frações HEX e BUT, o composto majoritário identificado foi a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona cuja estrutura química, determinada por RMN é apresentada.

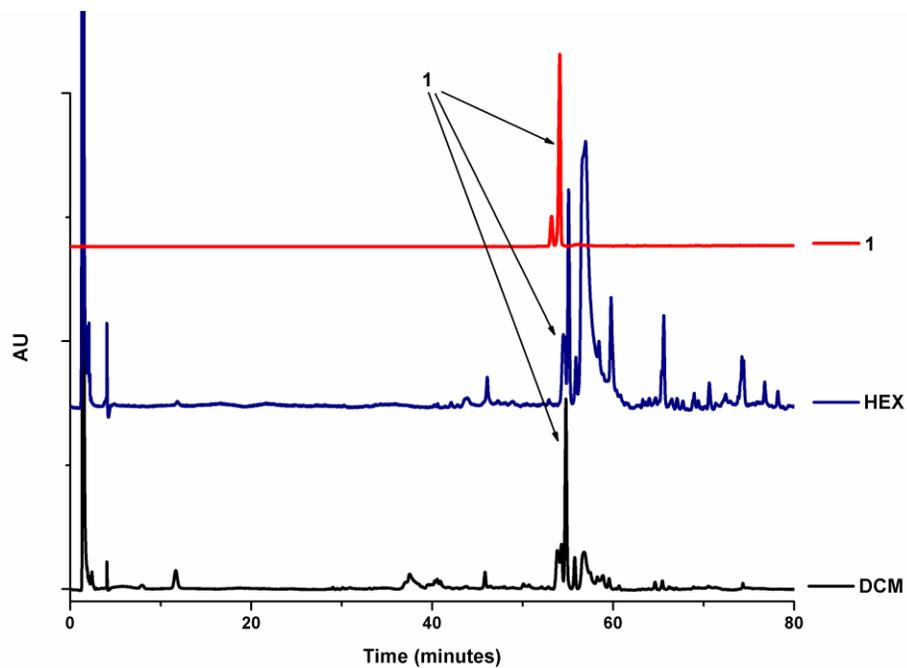


FIGURA 3: Perfil na CLAE das frações dcm e hex. O composto 1 (6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona) foi observado nos dois extratos (HEX e DCM) com um tempo de retenção de 54,1 min, mas em maior quantidade no extrato em DCM.

3.3 Assepsia e esterilização

Quando necessário, as soluções das drogas foram preparadas em condições assépticas e o material cirúrgico esterilizado por calor seco a 180°C ou foram adquiridos estéreis e descartados após o uso.

3.4 Drogas e reagentes

Os reagentes e drogas usados foram de grau analítico e foram adquiridos de companhias com comprovada certificação de qualidade. As soluções estão descritas em Anexo.

3.4.1 Drogas

Carragenina, indometacina, dipirona, lipopolissacarídeo (*Escherichia coli* 0111:B4), prostaglandina E₂, Cloridrato de Dopamina, Dibutiril adenosina monofosfato cíclico, glibenclamida adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Quetamina e xilazina foram adquiridos do Laboratório Syntec (Cotia, SP, Brasil). Dexametasona foi adquirida do laboratório Química Santa Marina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Halotano, fentanil e diazepam foram adquiridos do laboratório Cristália (São Paulo, SP, Brasil). Oxitetraciclina foi adquirida da Pfizer (São Paulo, SP, Brasil). Orto-fenilediamina (o-PD), Anticorpo monoclonal anti-TNF- α de rato (MAB 510), anticorpo biotilado anti-TNF- α de rato (BAF 510), padrão proteína recombinante TNF- α de camundongo (510 RT) e estreptoavidina foram adquiridos da R&D Systems (Pittsburgh, PA, USA) e kits para dosagem de IL-6 e IL-1 β foram adquiridos da Ebioscience (San Diego, CA, USA). Heparina foi adquirida da Bleusiegel (São Paulo, SP, Brasil), usada para coleta de sangue por punção cardíaca.

3.4.2. Diluição e vias de administração.

O extrato bruto, frações e composto isolado foram diluídos em Tween 20 1%, a indometacina em tampão TRIS 1 M pH 8, a dipirona em água para injeção e foram administradas por via oral. O volume de veículo administrado foi fixado em 10 ml/kg.

A glibenclamida em Tween 80 1%, a carragenina, prostaglandina, dopamina e dibutiril AMP_c foram diluídos em salina estéril. O volume injetado por via intraplantar foi de 20 µl.

A dexametasona, cetamina, xilasina e o LPS foram diluídos em salina estéril. O volume foi de 10 ml/Kg por via subcutânea ou intraperitoneal.

3.5 Edema de pata induzido por carragenina

Para avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato bruto, frações e composto isolado foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, conforme descrito anteriormente por Kassuya e colaboradores (Kassuya, 2009). A espessura da pata traseira dos animais foi avaliada utilizando-se um micrômetro digital (Metal Great Tools Co. MT-045B) para a obtenção dos valores basais em µm. Em seguida, os animais foram tratados por via oral com extrato bruto (10, 30 e 100 mg/kg) ou com as frações BUT (12 mg/kg), AcEt (10 mg/kg), DCM (2,5 mg/kg) e HEX (2 mg/kg) ou com o composto isolado na dose de 1 mg/kg ou 50, 150 e 500 µg/pata. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume (10 ml/kg) de veículo (Tween 20 1%), ou dexametasona (1 mg/kg) usada como controle positivo. As doses das frações e do composto isolado em todos os modelos experimentais foram calculadas com base na dose de 30 mg/kg do extrato bruto, a partir do respectivo rendimento. Após 1 h, os animais receberam uma injeção intraplantar (i.pl.) de 300 µg de carragenina diluída em 20µl de solução fisiológica estéril na pata direita. Como controle da injeção, em alguns animais, na pata contralateral foi injetado o mesmo volume de veículo. Após a injeção de carragenina, foram realizadas quatro

medidas da espessura das patas nos tempos de 0,5, 1, 2 e 4 h. A variação (Δ) da espessura da pata foi quantificada em μm , usando o micrômetro digital.

3.6 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

O modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi realizado como descrito anteriormente (Koster, 1959). Os animais foram colocados sob um cilindro de vidro por 10 min para ambientação. Ácido acético 0,8% (v/v, 10 ml/kg) foi injetado por via i.p. nos animais pré-tratados 1 h antes com o extrato bruto de *S. canescens* (3, 10, 30 e 100 mg/kg) ou indometacina (5 mg/kg) por via oral. Cada camundongo retornou então ao cilindro de vidro e a intensidade do comportamento nociceptivo foi quantificada pelo número de contorções abdominais durante 20 min após a injeção do ácido. A contorção abdominal consiste da contração do músculo abdominal seguida do estiramento das patas traseiras.

3.7 Nocicepção induzida pela formalina

A atividade antinociceptiva do extrato bruto foi avaliada também através do modelo de nocicepção induzido pela formalina. O procedimento foi realizado conforme descrito por Hunskaar e Hole (Hunskaar et al, 1987). Os animais foram colocados sob um funil de vidro invertido por pelo menos 20 min para adaptação. Atrás dos funis, foi colocado um espelho para facilitar a observação do comportamento nociceptivo (lambida da pata). Uma hora antes da injeção de formalina, os animais foram tratados por via oral com extrato bruto (10, 30 e 100 mg/kg), veículo (Tween 20 1%) ou indometacina (5 mg/kg) utilizada como controle positivo. Os animais receberam uma injeção i.pl. de formalina 2,5% v/v (0,92% formaldeído) na pata posterior direita e em seguida foram colocados sob um funil de vidro. O comportamento nociceptivo (tempo que o animal permaneceu lambendo a pata injetada) foi avaliado por 40 min, cronometrados em intervalos de 5 min. Este modelo de nocicepção é dividido em duas fases, sendo que os primeiros

5 min foram considerados a fase neurogênica, em que há um estímulo direto da formalina no nociceptor. Já a segunda fase, que ocorreu entre os 15 e 40 min finais, é caracterizada por ser uma fase inflamatória.

3.8 Hiperalgisia mecânica induzida por carragenina.

Outro modelo utilizado para avaliar a possível atividade antinociceptiva do extrato bruto, das frações e do composto isolado foi o modelo de hiperalgisia mecânica induzida pela carragenina. O procedimento foi executado de acordo conforme descrito anteriormente (Mori, 2011). Neste experimento os camundongos foram colocados em caixas de acrílico, sobre uma tela de arame, para que se tenha acesso à parte inferior da pata do animal. Após o período de adaptação de 2 h, foram utilizados uma série de filamentos *de von Frey* (Stoeling, Chicago, Il, USA), com a gramatura variando de 0,008 g a 4 g, aplicados por 2 s com intervalo de 10 s na pata posterior direita em ordem crescente ou decrescente, em função da resposta do animal que é caracterizada pela retirada da pata. Inicia-se o experimento com o filamento de 400 mg, sendo que, na ausência de resposta testa-se o filamento superior de 1000 mg. Por outro lado, caso o animal responda ao primeiro filamento de 400 mg, o filamento testado é o anterior de menor gramatura (160 mg) e assim sucessivamente obtendo-se 6 medidas. O limiar de retirada da pata (50% do limiar) foi calculado de acordo com Dixon (Dixon, 1980) e é representado pela seguinte equação:

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

O limiar 50% basal foi realizado no dia anterior aos experimentos. No dia seguinte os animais receberam por via oral o extrato bruto na dose de 30 mg/kg, ou as doses de 12, 10, 2,5 e 2 mg/kg das frações BUT, DCM, AcEt ou HEX, respectivamente. Após 1 h foi injetado carragenina (300 µg, diluída em 20 µl) e o limiar mecânico foi novamente avaliado após 3 h.

Em um experimento adicional, a hiperalgesia mecânica foi induzida por PGE₂ (100 ng/pata) ou dopamina (3 µg/pata) ou dibutilil AMP_c (5 µg/pata) 1 h após o tratamento por via oral com a mesma dose de extrato bruto ou dipirona (150 mg/kg, controle positivo) ou os respectivos veículos. A dipirona foi incluída como controle positivo neste experimento por ser capaz de reverter a hiperalgesia induzida por todos estes estímulos (Souza et al, 2015). Na avaliação da hiperalgesia mecânica induzida por PGE₂ foi incluído ainda um controle negativo, a indometacina (5 mg/kg, por via oral) que é um inibidor não seletivo da COX, enzima chave envolvida na produção de prostaglandinas. A avaliação do limiar mecânico foi então feita 3 h após a injeção de PGE₂ ou dopamina, ou AMP cíclico conforme descrito anteriormente.

Em um experimento subsequente, os animais também foram pré-tratados com o bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP, glibenclamida, na dose de 80 µg/pata. Logo após esta injeção, foram tratados por via oral com o composto isolado (0,15 mg/kg) ou veículo ou dipirona (150 mg/kg). Após 1 h a hiperalgesia mecânica foi induzida por PGE₂ (100 ng/pata) e a avaliação do limiar mecânico foi então feita 3 h após a injeção de PGE₂.

3.9 Teste da placa aquecida

O teste da placa aquecida foi utilizado para avaliar o efeito do extrato bruto sobre a nocicepção térmica, de acordo com o método descrito por anteriormente (Eddy et al, 1953), com algumas modificações. Neste experimento, o aparelho de placa aquecida foi mantido a 54 ±1° C. O animal foi colocado sobre a placa aquecida, sendo que um anteparo retangular de vidro impedia a fuga e permitia a observação do comportamento nociceptivo. O tempo decorrido entre a colocação do animal e o aparecimento de comportamentos como balançar ou lambe as patas traseiras foi considerado como índice de latência. Para prevenir o dano tecidual, os animais permaneciam por no máximo 30 s (tempo de corte) sobre a placa. Cada animal foi testado antes da administração das drogas a fim de se usar apenas os animais com uma reposta entre 10 a 15 s (latência basal). Em seguida,

os animais foram tratados com o extrato bruto na dose de 30 mg/kg por via oral, ou o mesmo volume de veículo (Tween 20 1%) 1 h antes de um novo teste na placa quente ou fentanil (100 µg/kg, s.c.) como controle positivo 15 min antes de um novo teste (latência pós-droga). Os dados foram apresentados como porcentagem do Máximo Efeito Possível (%MEP), calculado conforme a equação: $\%MEP = (\text{latência pós-droga} - \text{latência basal} / \text{tempo de corte} - \text{latência basal}) \times 100$.

3.10 Efeito sobre o desempenho motor (rota-rod)

Sabendo que o comportamento nociceptivo depende do perfeito desempenho motor dos animais (lamber ou balançar a pata, por exemplo) a avaliação deste parâmetro permite uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos testes de nocicepção. Assim, drogas que promovem sedação e/ou relaxamento alteram o desempenho motor sem necessariamente serem antinociceptivas. Este teste foi desenvolvido conforme descrito anteriormente (Dunham, 1957) e o desempenho motor foi avaliado no aparelho “rota-rod” (modelo DS 37 Ugo Basille). Foram utilizados 3 grupos, sendo computado o tempo basal de permanência (em s) na barra giratória (velocidade aproximada de 22 rpm). O tempo de corte para este experimento foi 3 min. Os grupos foram tratados por via oral com o extrato bruto na dose de 30 mg/kg, ou o mesmo volume de veículo ou ainda diazepam (5 mg/kg, s.c.) usado como controle positivo. Uma hora após o tratamento com extrato bruto ou veículo ou 30 min após o tratamento com diazepam, os animais foram colocados sobre as barras e o tempo de permanência novamente avaliado.

3.11 Febre induzida por lipopolissacarídeo

A temperatura corporal dos animais foi avaliada através do implante abdominal de registradores de temperatura (Subcue data loggers, Calgary, Canadá) de acordo com a descrição anterior (Kassuya, 2009). Após anestésiar os

animais com cetamina 60 mg/kg e xilasina 7,5 mg/kg e sob condição asséptica, o registrador foi implantado na cavidade abdominal uma semana antes do experimento. Os animais foram tratados com oxitetraciclina (50mg/kg, por via intramuscular) ao final da cirurgia. No dia do experimento, a temperatura corporal foi registrada 2 h antes da administração de qualquer tratamento e por 6 h após a injeção do LPS, de forma contínua em intervalos de 15 min. O extrato bruto 30mg/kg, a fração DCM 2,5 mg/kg, a fração HEX 2,0 mg/kg, o composto isolado 0,1 mg/kg ou veículo (Tween 20 1%) foram administrados 1 h antes da injeção i.p. de LPS (100µg/kg). Como controle positivo para este experimento foi utilizada a indometacina (5 mg/kg) por via oral 1 h antes da administração de LPS. O experimento foi conduzido à temperatura ambiente de 30 ± 1 °C (zona de termoneutralidade para camundongos)(Rudaya, 2005).

3.12 Coleta de sangue para dosagem de citocinas.

Para a dosagem de citocinas os animais (mantidos em zona termo-neutra) foram anestesiados com Halotano, e o sangue foi coletado com seringa descartável heparinizada por punção cardíaca. Para dosagem de TNF- α , a coleta foi realizada 1 h após a injeção intraperitoneal de LPS e para IL-1 β e IL-6, 2 e 3 h após a injeção, respectivamente. Os animais foram tratados com intervalos de 10 minutos entre os grupos com o extrato bruto nas doses de 10 e 30 mg/kg ou o composto isolado na dose de 0,15 mg/kg ou veículo por via oral ou dexamentasona (1 mg/kg) subcutânea. Uma hora após o tratamento por via oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo, os animais receberam a injeção intraperitoneal de LPS (100 µg/kg) ou salina estéril. Passado o intervalo de tempo definido para cada citocina, o sangue foi coletado e centrifugado a 1200 g e a 4 °C por 10 min. O plasma foi então imediatamente coletado para dosagem de citocinas por ELISA.

3.13 Dosagem de citocinas

3.13.1 Dosagem de TNF- α

A dosagem dos níveis plasmáticos de TNF- α foi feita por ELISA. Foi usada uma placa de 96 poços, que foi coberta com 100 μ l/poço com anticorpo de captura para TNF- α (1 μ g/ml) e deixada a temperatura ambiente por 24 h. No dia seguinte a placa foi lavada com tampão de lavagem por três vezes, sendo usado o volume de 300 μ l de tampão por lavagem e após, adicionado o volume de 300 μ l de tampão de bloqueio em cada poço, para bloqueio de sítios inespecíficos. Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada por três vezes novamente com tampão de lavagem e então foram adicionados 100 μ l/poço das amostras diluídas (1:2) e o padrão TNF- α diluído em 7 concentrações (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,2 pg/ml). Após 24h, a placa foi novamente lavada utilizando-se tampão de lavagem e então foram adicionados 100 μ l/poço de anticorpo anti-TNF- α de detecção, biotilado (50 ng/ml). A placa foi incubada por 2 h e após este período, a placa foi novamente lavada, e foi acrescentada a solução de estreptoavidina 100 μ l/poço (concentração definida no lote) e a placa incubada por 20 min. Após este período, à placa foi adicionado 150 μ l/poço de solução de OPD, juntamente com 5 μ l de peróxido de hidrogênio 30% em sala escura. A placa foi então coberta com papel alumínio e mantida por 30 min. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 M. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 492 nm.

3.13.2 Dosagem de IL-1 β e IL-6.

Preparo da placa

A dosagem dos níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-6 foi feita por ELISA através de Kits. De forma geral, foram transferidos 100 μ l de anticorpo de captura diluído em PBS da citocina a ser dosada para cada poço de uma placa de ELISA

com 96 poços. A placa é selada e incubada por 24 h à temperatura ambiente. Os poços são então aspirados e lavados com 300 µl tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 4,0) por 3 vezes. Após, adiciona-se 100 µl do tampão de bloqueio (PBS, BSA e sacarose 5%) por um período mínimo de 1 h. O processo de lavagem é então repetido. As placas estão prontas para receber as amostras. Cada amostra, padrão e branco foram testados em duplicata. No dia seguinte, a placa foi lavada novamente conforme protocolo anterior. Foi adicionado 100 µl de estreptoavidina com peroxidase em cada poço e a placa foi incubada por 20 min à temperatura ambiente. Após nova lavagem foi adicionado 100 µl de solução substrato (1:1, peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina) e a placa novamente incubada por 30 min à temperatura ambiente, evitando luz direta sobre a placa. Após este período, foi adicionado então uma solução de 1M H₂SO₄ a fim de interromper a reação. A absorbância foi avaliada à 620 nm.

3.14 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via ou de duas vias para medidas repetidas (edema e febre). Foi aplicado o pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni para avaliar as diferenças entre os grupos, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do extrato bruto sobre o edema de pata induzido por carragenina

A administração somente de veículo na pata esquerda do animal não promoveu alterações significativas no volume da pata dos animais (Fig. 4). A injeção de carragenina induziu a formação de edema, caracterizado pelo aumento significativo da espessura da pata. A formação do edema em resposta à injeção de carragenina teve seu início em 0,5 h e seu pico em 1 h, sendo que seu efeito permaneceu até a quarta hora. O tratamento dos animais com o extrato bruto na dose de 10 mg/kg não modificou significativamente o edema induzido pela carragenina (Fig. 4). O extrato bruto nas doses de 30 mg/kg e 100 mg/kg reduziu significativamente a espessura da pata (66% e 68% respectivamente) nos tempos de 1, 2 e 4h após a injeção de Cg (Fig. 4). A dexametasona também foi capaz de inibir a formação do edema e foi usada como controle positivo.

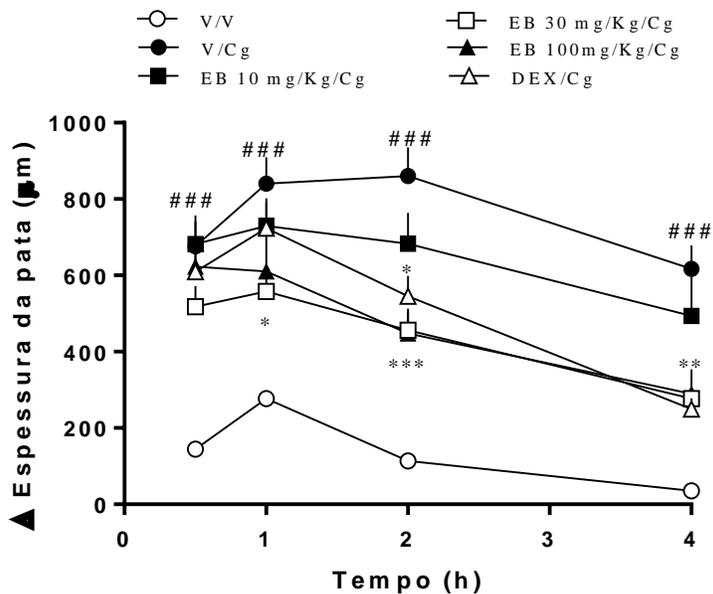


FIGURA 4: EFEITO DO EXTRATO BRUTO SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com o diferentes doses do extrato bruto (EB, 10, 30 ou 100 mg/kg, v.o.), ou veículo (V, Tween 20 1%, v.o.) ou Dexametasona (DEX, 1mg/kg, s.c.). A carragenina foi injetada 1 h após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo, por via i.pl. A pata contralateral recebeu apenas o mesmo volume de solução salina estéril (V). Cada ponto representa a média \pm E.P.M da variação da espessura da pata (em μm) (n=9). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V/V (### p<0,001) ou em relação ao grupo V/Cg (* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.2 Efeito do extrato bruto sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

A administração de ácido acético em animais tratados somente com o veículo (Tween 20, 1%) promoveu aproximadamente 60 contorções em um período de 20 min (Fig. 5). O tratamento dos animais com extrato bruto nas doses de 3 e 10 mg/kg não foi efetivo na redução do número de contorções (Fig. 5). Entretanto, o tratamento dos animais com o extrato bruto nas doses de 30 e 100 mg/kg por via oral reduziu significativamente o número de contorções abdominais de maneira similar ao controle positivo indometacina (Fig.5).

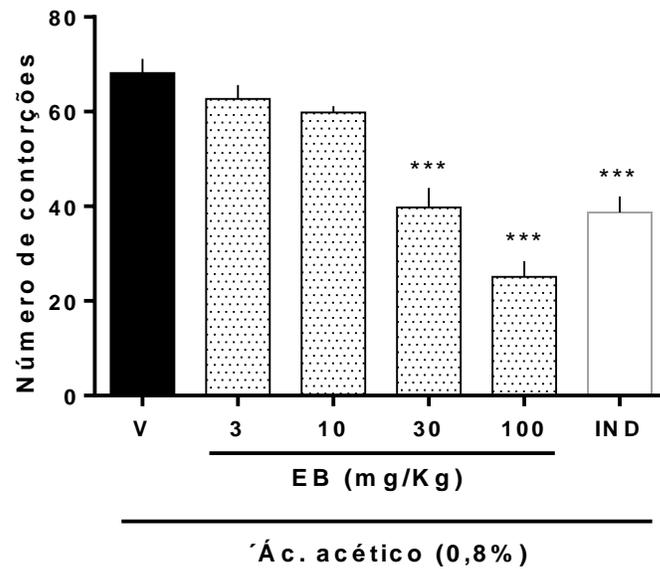


FIGURA 5: EFEITO DO EXTRATO BRUTO SOBRE O NÚMERO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com diferentes doses do extrato bruto (EB, 3, 10, 30 ou 100 mg/kg, v.o.) ou com veículo (V, Tween 20 1%, v.o.) ou indometacina (IND 5 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da injeção i.p. de ácido acético 0,8 %. O número de contorções abdominais após a injeção de ácido acético foi avaliado por 20 min. As barras representam a média \pm E.P.M do número de contorções abdominais (n=7-14). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V (**p<0,001).

4.3 Efeito do extrato bruto sobre a nocicepção induzida pela formalina

A injeção de formalina (2,5%) i.pl. induziu a uma resposta característica, que pode ser dividida em duas fases (Fig. 6A). A fim de facilitar a visualização do efeito dos tratamentos, as fases foram representadas separadamente em fase I (0-5 min, Fig. 6B) e fase II (15 a 40 min, Fig. 6C). O tratamento dos animais com o extrato bruto em qualquer das doses testadas ou com indometacina não modificou o comportamento nociceptivo na fase I (Fig. 6B). De forma similar, o tratamento dos animais com extrato bruto na dose de 10 mg/kg também não inibiu o comportamento nociceptivo dos animais na fase II da formalina. Já nas doses de 30 e 100 mg/kg, o extrato bruto inibiu o comportamento nociceptivo na fase inflamatória em 36,8% e 38,4% respectivamente, estatisticamente semelhantes ao controle positivo usado, a indometacina (Fig. 6 A e C).

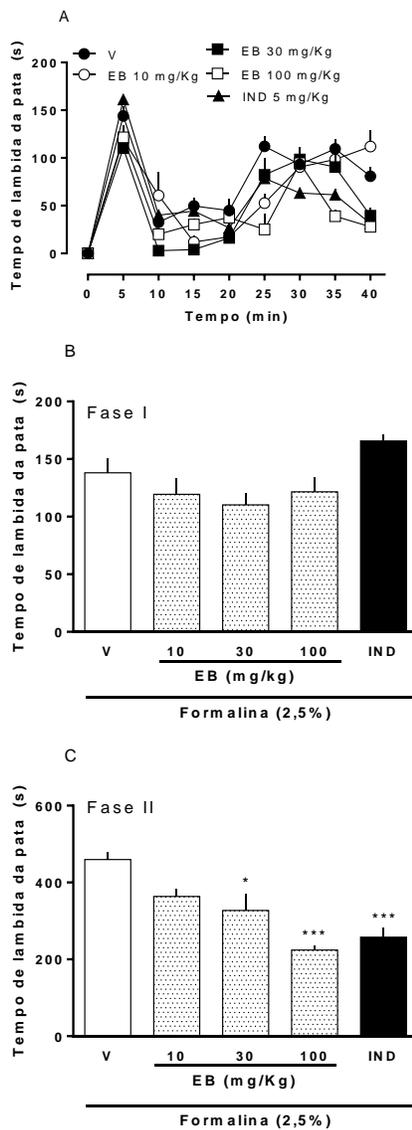


FIGURA 6: EFEITO DO EXTRATO BRUTO SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com extrato bruto (EB 10, 30 ou 100 mg/Kg, v.o.) ou indometacina (5 mg/kg, v.o.) ou veículo (V, Tween 20 1% v.o.). Após 1 h foram injetados 20 μ l formalina (2,5%) na pata posterior direita dos animais e avaliou-se o tempo de lambida da pata por 40 min em blocos de 5 min (painel A). Os painéis B e C representam somatório dos tempos na fase I ou II, respectivamente. Cada ponto ou barra representa a média \pm E.P.M do tempo de lambida da pata em s (n=7-14). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V (* p<0,05, ***p<0,001).

4.4 Efeito do extrato bruto sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina.

No grupo tratado apenas com o veículo houve uma diminuição no limiar mecânico após a injeção da carragenina (Fig. 7). Os animais foram tratados apenas com a dose de 30 mg/kg do extrato bruto, já que foi a menor dose efetiva testada nos experimentos anteriores. O tratamento dos animais com o extrato bruto v.o. impediu a diminuição no limiar mecânico promovida pela carragenina em 88,2% de maneira similar ao controle positivo utilizado, a indometacina v.o., na dose de 5 mg/Kg (Fig. 7).

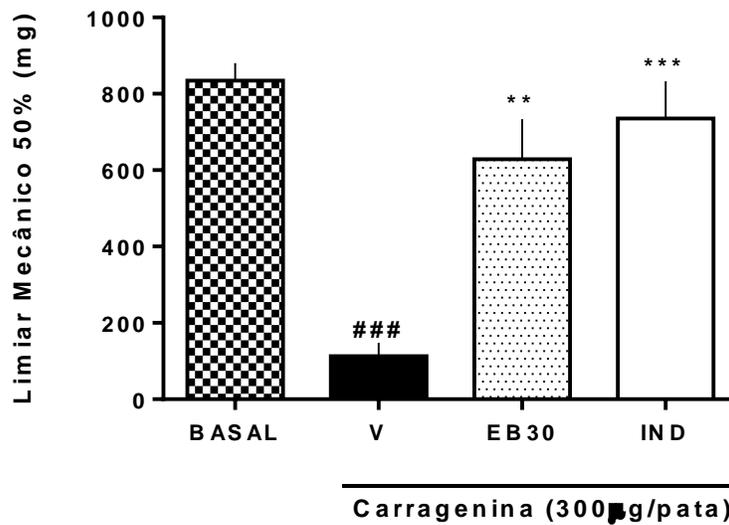


FIGURA 7: EFEITO DO EXTRATO BRUTO SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS: O limiar mecânico foi avaliado para cada animal (BASAL) e então os animais foram tratados com extrato bruto (EB, 30 mg/Kg) ou veículo (V, Tween 20 1%) ou indometacina (IND, 5 mg/Kg) por via oral. A carragenina foi injetada i.pl. 1 h após o tratamento e o limiar mecânico avaliado 3 h após a injeção de carragenina utilizando os filamentos de *von Frey*. As barras representam a média \pm E.P.M do limiar mecânico 50 (n=7). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo basal (### p<0,001) ou em relação ao grupo V (** p<0,01, *** p<0,001)

4.5 Efeito do extrato bruto sobre a nocicepção térmica

A administração de veículo não alterou o tempo de permanência dos animais na placa aquecida (Fig. 8). O extrato bruto na dose que causou efeitos antinociceptivos nos testes de contorções abdominais, formalina e hiperalgesia mecânica também não aumentou o tempo de permanência dos animais na placa aquecida (Fig. 8). Diferentemente, o fentanil aumentou significativamente (82%) o tempo de permanência dos animais na placa aquecida (Fig. 8).

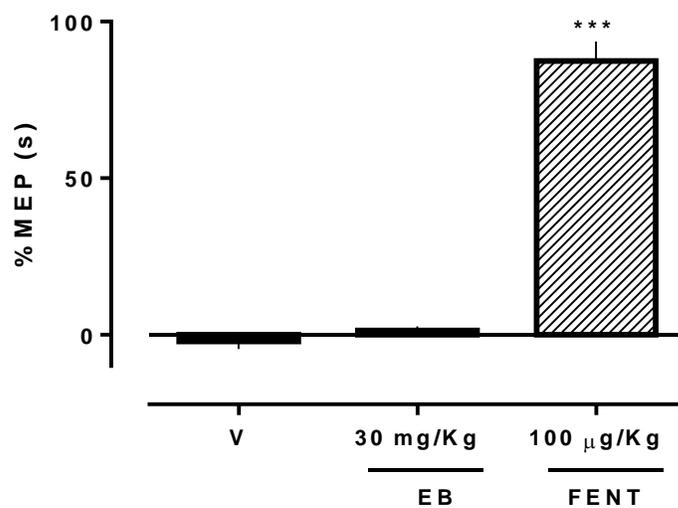


FIGURA 8: EFEITO DO EXTRATO BRUTO SOBRE A NOCICEPÇÃO TÉRMICA EM CAMUNDONGOS. Os animais selecionados com um tempo de latência basal entre 10-15 s foram tratados com veículo (V, Tween 20 1%, v.o.), ou o extrato bruto (EB, 30 mg/Kg, v.o.) ou fentanil (FENT, 100 µg/Kg, s.c) e submetidos ao teste da placa aquecida, uma hora após o tratamento por oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo. As barras representam a média \pm E.P.M da %MEP (n=7). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V (***) $p < 0,001$

4.6 Efeito do extrato bruto sobre o desempenho motor

Os animais permaneceram no rota-rod por um período próximo ao máximo após a administração de veículo (Fig. 9). A administração do extrato bruto na dose antinociceptiva não alterou o desempenho motor dos animais no teste (Fig. 9). O controle positivo Diazepam diminuiu significativamente o tempo de permanência dos animais no aparato (Fig. 9)

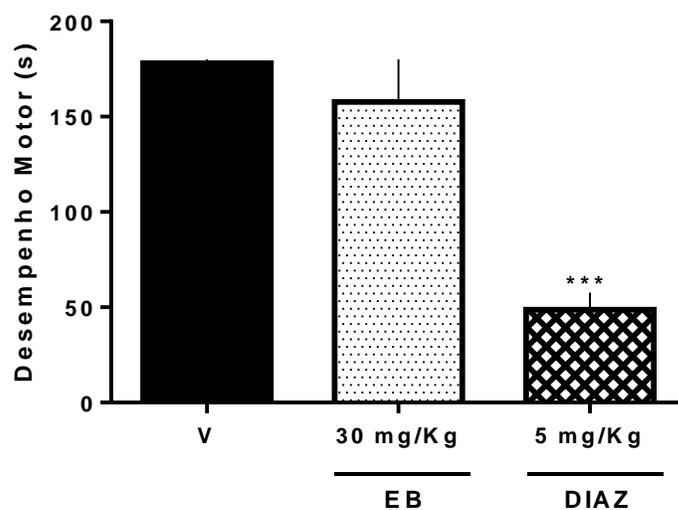


FIGURA 9: EFEITO DO EXTRATO BRUTO SOBRE O DESEMPENHO MOTOR DOS CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com veículo (V, v.o.) ou extrato bruto (EB, 30 mg/Kg, v.o.) ou diazepam (DIAZ, 5 mg/kg, s.c.). Uma hora após o tratamento por via oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo, os animais foram colocados no rota-rod e o tempo de permanência no aparelho foi avaliado. As barras representam a média \pm E.P.M do desempenho motor em s (n=7). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V (***) $p < 0,001$).

4.7 Efeito do extrato bruto sobre a resposta febril e sobre o aumento da concentração plasmática de TNF- α induzido pela administração de LPS.

A administração de extrato bruto por via oral não promoveu alterações significativas na temperatura corporal dos animais. A administração i.p de LPS promoveu uma resposta febril que iniciou-se 2 h após a injeção e permaneceu significativamente elevada até a quarta hora (Fig. 10). O tratamento dos animais com o extrato bruto (30 mg/Kg v.o.) inibiu o aumento da temperatura corporal de maneira similar à indometacina (5 mg/Kg, v.o) (Fig. 10).

Na figura 11 observamos que a administração do extrato bruto não alterou os níveis basais de TNF- α . A administração de LPS promoveu o aumento da concentração plasmática de TNF- α (Fig. 11). O tratamento dos animais com o extrato bruto na mesma dose inibiu este aumento, de maneira similar à dexametasona, usada como controle positivo (Fig. 11).

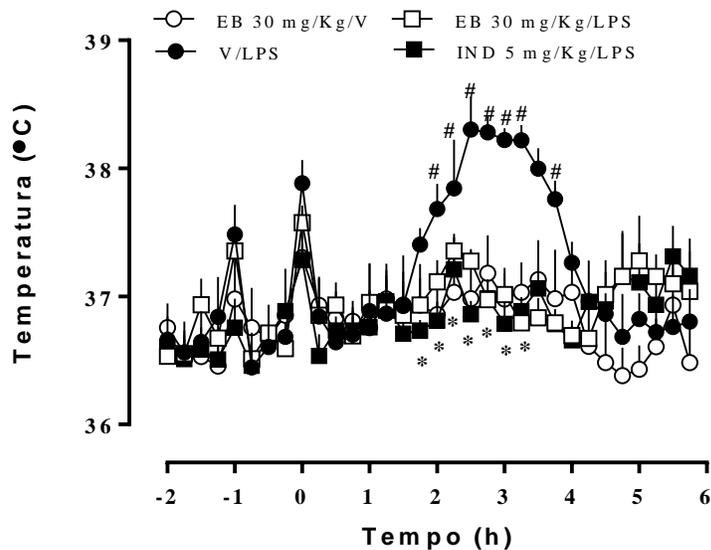


FIGURA 10: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com extrato bruto (EB, 30 mg/Kg, v.o.) ou o mesmo volume de veículo (V, Tween 20 1%) ou indometacina (IND, 5 mg/kg v.o.). Uma hora após tratamento oral, os animais receberam LPS (100 µg/Kg i.p, tempo 0) ou o mesmo volume de veículo (V, salina) e a temperatura corporal foi avaliada por 6 h. Os pontos representam a média \pm E.P.M da temperatura corporal (°C) (n=7). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo EB/V (# p<0,05) ou em relação ao grupo V/LPS (* p<0,05).

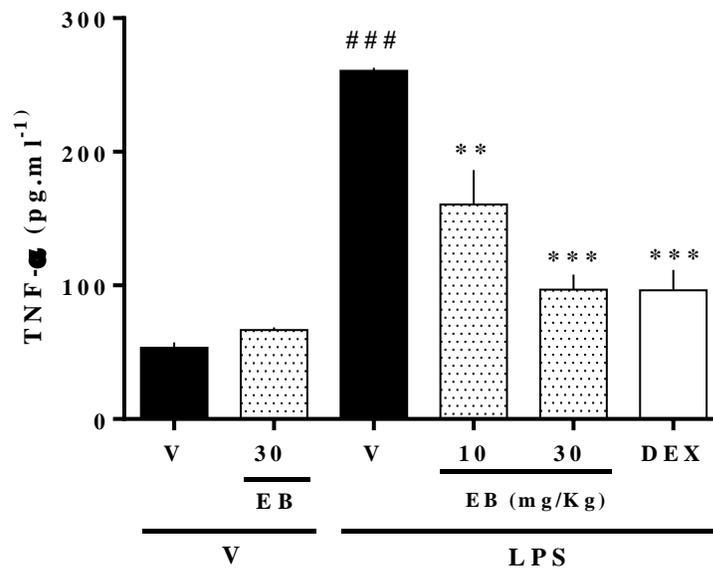


FIGURA 11: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO SOBRE O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF- α INDUZIDA POR LPS EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com extrato bruto (EB, 10 ou 30 mg/Kg, v.o.) ou o mesmo volume de veículo (V, Tween 20 1%) ou com Dexametasona (DEX, 1 mg/kg, s.c.). Uma hora após tratamento v.o. ou 30 min após o tratamento s.c. os animais receberam LPS (100 μ g/kg) ou veículo (V, salina) i.p. As barras representam a média \pm E.P.M da concentração plasmática de TNF- α (pg/ml) (n=6). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V/V (### p<0,001) ou em relação ao grupo V/LPS (** p<0,01, *** p<0,001).

4.8 Efeito das frações sobre o edema de pata e sobre a hiperalgesia mecânica induzidos pela carragenina.

Após a identificação dos efeitos do extrato bruto foram testadas as diferentes frações. A figura 12 mostra que as frações BUT (Fig. 12A) e AcEt (Fig. 12B) não reverteram o edema de pata induzido pela carragenina. Já as frações DCM (Fig. 12C) e HEX (Fig. 12D), nas doses testadas, inibiram significativamente a formação do edema de maneira similar ao controle positivo dexametasona.

As frações BUT e AcEt também não reduziram a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina (Fig. 13). Por outro lado, as frações DCM e HEX, nas doses utilizadas, aboliram a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina, de maneira similar à indometacina (Fig. 13).

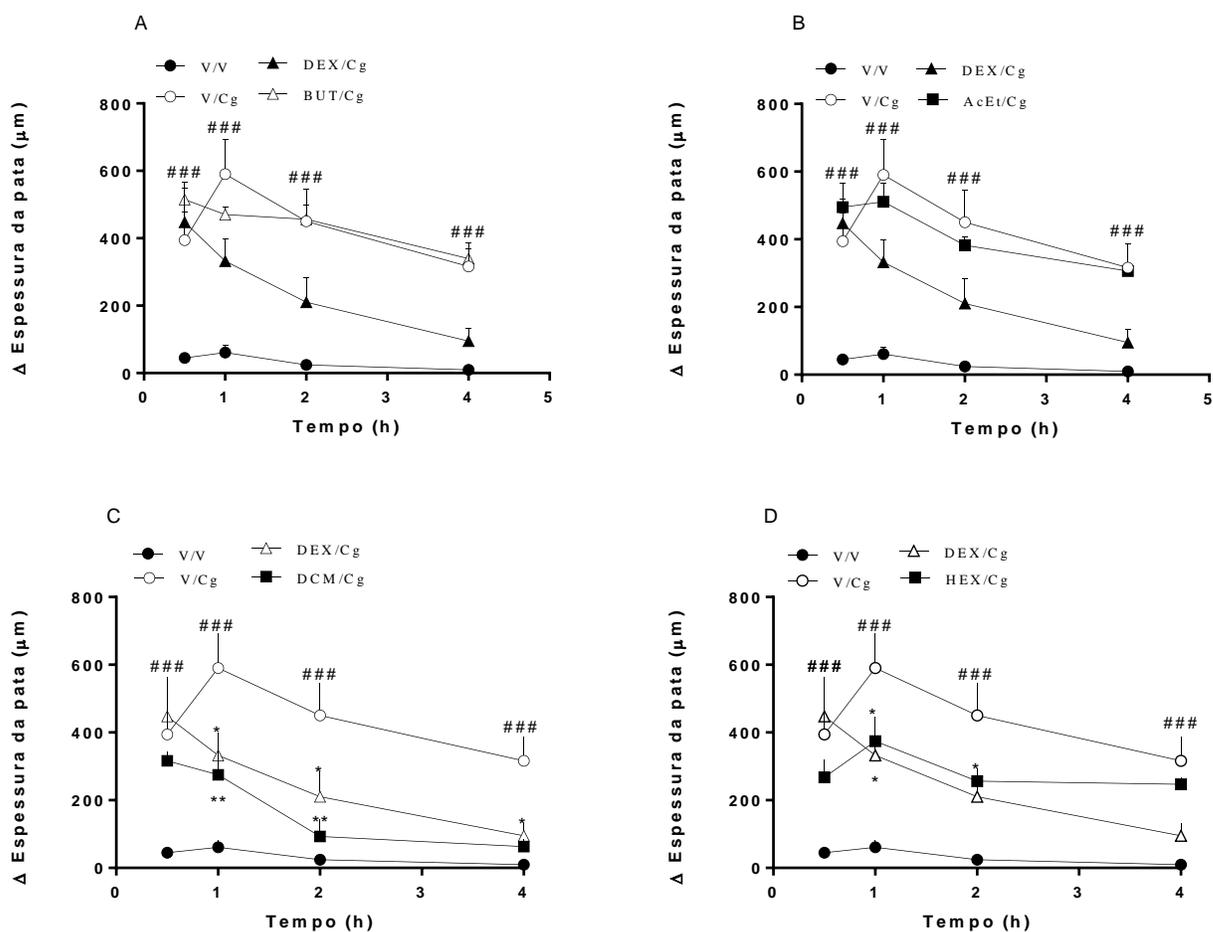


FIGURA 12: EFEITO DAS FRAÇÕES SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados por via oral com as frações butanol (BUT, 12 mg/Kg, painel A), acetato de etila (AcEt, 10 mg/kg, painel B), diclorometano (DCM, 2,5 mg/Kg, painel C), hexano (HEX, 2,5 mg/Kg, painel D) ou veículo (V, Tween 20 1%) ou com Dexametasona (DEX, 1 mg/kg, s.c.). A carragenina foi injetada 1 h após o tratamento oral, ou 30 min após o tratamento subcutâneo, por via i.pl. A pata contralateral recebeu apenas o mesmo volume de solução salina estéril (V). Os pontos representam a média \pm E.P.M da variação da espessura da pata (em μm) ($n=9$). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V/V (### $p<0,001$) ou em relação ao grupo V/Cg (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

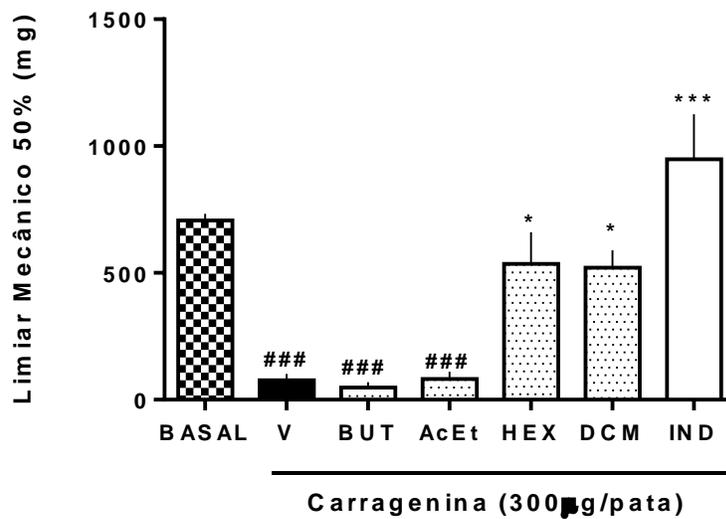


FIGURA 13: EFEITO DAS FRAÇÕES SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. O limiar mecânico foi avaliado para cada animal (BASAL) e então os animais foram tratados com as frações butanol (BUT, 12 mg/Kg, painel A), acetato de etila (AcEt, 10 mg/kg, painel B), diclorometano (DCM, 2,5 mg/Kg, painel C), hexano (HEX, 2,5 mg/Kg, painel D) ou veículo (V, Tween 20 1%) ou com Dexametasona (DEX, 1 mg/kg, s.c.). A carragenina foi injetada i.pl. 1 h após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento s.c. e o limiar mecânico avaliado 3 h após a injeção de carragenina utilizando os filamentos de *von Frey*. As barras representam a média \pm E.P.M do limiar mecânico 50% (n=7-14). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo basal (### p<0,001) ou em relação ao grupo V (*p<0,05, *** p<0,001)

4.9 Efeito das frações DCM e HEX sobre a febre induzida pela administração de LPS.

Como apenas as frações DCM e HEX apresentaram um efeito importante tanto na reversão do edema quanto da hiperalgesia mecânica, foi também avaliado se estas frações seriam efetivas em reverter a febre induzida pela administração de LPS. A administração i.p de LPS promoveu uma resposta febril que se iniciou 2 h após a injeção e permaneceu significativamente elevada até a quarta hora (Fig. 14). O tratamento dos animais com o as frações DCM (2,5 mg/Kg v.o.; painel A) ou HEX (2,0 mg/Kg, v.o.; painel B) inibiu a resposta febril induzida por LPS de maneira similar à indometacina (5 mg/Kg, v.o) (Fig. 14).

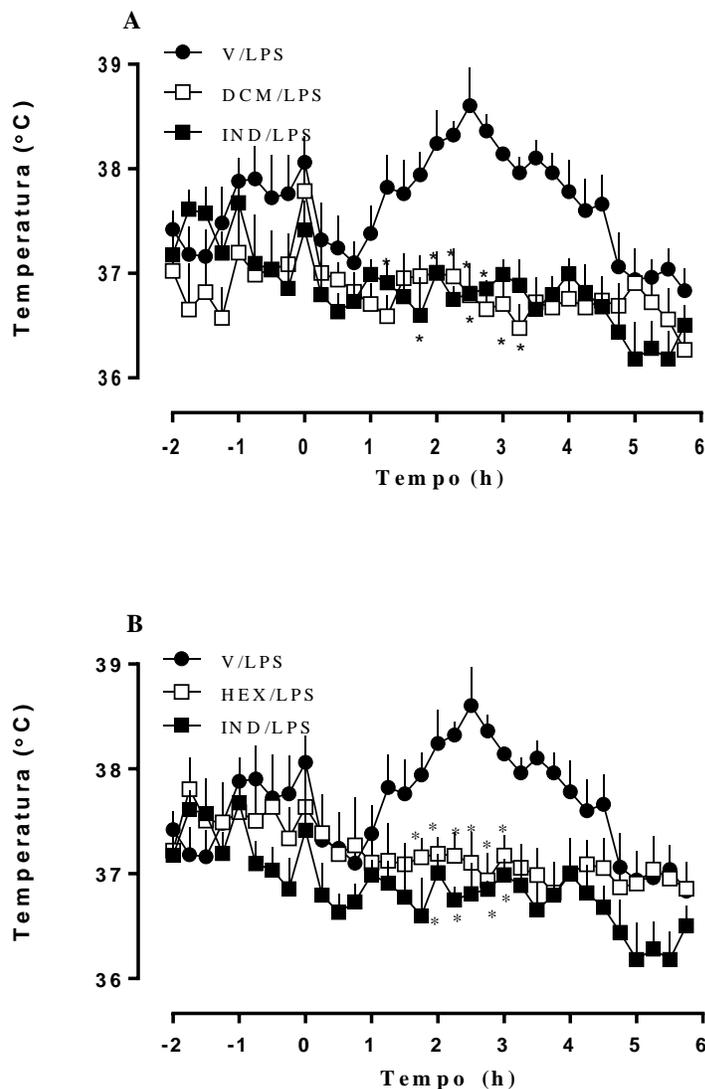


FIGURA 14: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DAS FRAÇÕES DCM E HEX SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR LPS EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com as frações diclorometano (DCM, 2,5 mg/Kg, v.o. painel A), hexano (HEX, 2,5 mg/Kg, v.o., painel B) ou o mesmo volume de veículo (V, Tween 20 1%) ou indometacina (IND, 5 mg/kg v.o.). Uma hora após o tratamento oral, os animais receberam LPS (100 µg/Kg i.p, tempo 0) e a temperatura foi avaliada por 6 h. Os pontos representam a média ± E.P.M da temperatura corporal (°C) (n=7). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V/LPS (* p<0,05).

4.10. Efeito da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona sobre o edema de pata induzido pela carragenina.

A administração somente de veículo na pata esquerda do animal não promoveu alterações significativas no volume da pata dos animais (Fig. 15). A injeção de carragenina induziu a formação de edema, caracterizado pelo aumento significativo da espessura da pata (Fig. 15). A formação do edema em resposta à injeção de carragenina teve seu início em 0,5 h e seu pico após 1 h, sendo que seu efeito permaneceu até a quarta hora. O tratamento dos animais com o composto isolado, a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona, na dose de 0,15 mg/kg reduziu significativamente a espessura da pata (Fig. 15).

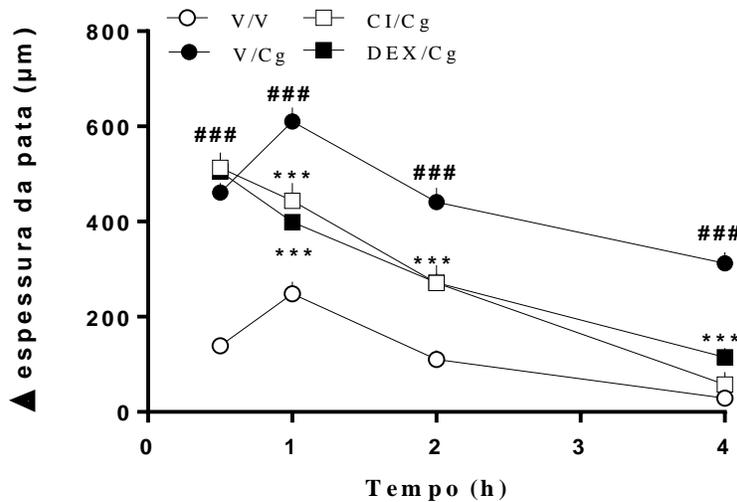


FIGURA 15: EFEITO DO COMPOSTO ISOLADO SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com o composto isolado (CI, 0,15 mg/kg, v.o.), ou veículo (V, Tween 20 1%, v.o.) ou Dexametasona (DEX, 1mg/kg, s.c.). A carragenina foi injetada 1 h após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo, por via i.pl. A pata contralateral recebeu apenas o mesmo volume de solução salina estéril (V). Cada ponto representa a média \pm E.P.M da variação da espessura da pata (em μm) (n=8). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V/V (### p<0,001) ou em relação ao grupo V/Cg (***p<0,001).

4.11 Efeito da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela dopamina, prostaglandina E₂ e dibutilil AMP_C.

Nos grupos tratados apenas com o veículo houve uma diminuição no limiar mecânico após a aplicação de dopamina, PGE₂ e dibutilil AMP_C (Fig. 16). O tratamento dos animais com o composto isolado (0,15 mg/Kg) não impediu a diminuição no limiar mecânico promovida tanto pela dopamina (3 μ g/pata, fig. 16) quanto pelo dibutilil AMP_C (5 μ g/pata, fig. 16). Por outro lado, o tratamento com o composto isolado, nesta mesma dose, impediu a diminuição no limiar mecânico promovida pela PGE₂ (100 ng/pata, fig. 16). É importante ressaltar que o controle positivo utilizado, a dipirona v.o., na dose de 150 mg/Kg (Fig. 16) reverteu completamente a hiperalgesia mecânica induzida por dopamina, PGE₂ e dbAMP_C. Neste experimento, utilizamos ainda um controle negativo para hiperalgesia induzida por PGE₂, a indometacina. Como esperado, a indometacina não reverteu a hiperalgesia mecânica induzida por PGE₂.

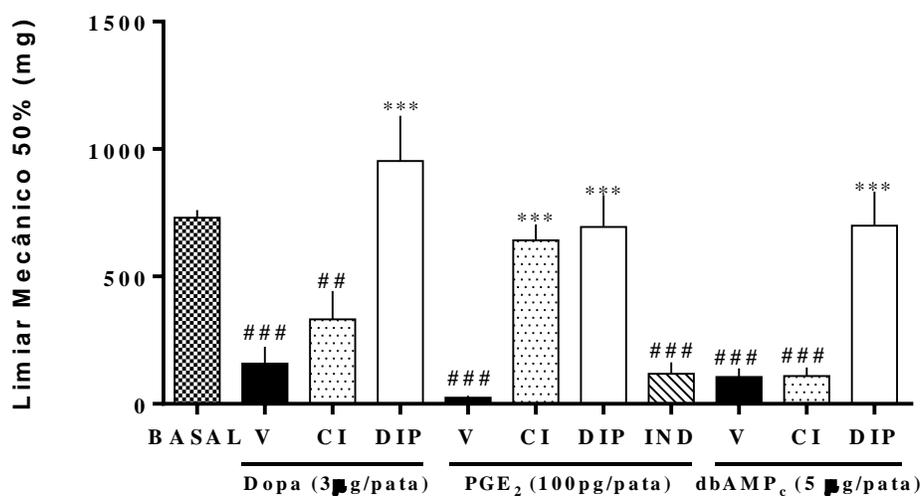


FIGURA 16: EFEITO DA 6-METOXI-7-HIDROXI- α -DUNIONA SOBRE A HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR DOPAMINA, PGE₂ E POR dbAMP_c EM CAMUNDONGOS. O limiar mecânico foi avaliado para cada animal (BASAL) e então os animais foram tratados com o composto isolado 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona (CI, 0,15 mg/Kg, v.o.) ou veículo (V, Tween 20 0.1%, v.o.) ou dipirona (DIP, 150 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da aplicação de dopamina (Dopa, 3 µg/pata) ou prostaglandina E₂ (PGE₂, 100 ng/pata) ou dibutilil AMP_c (dbAMP_c, 5 µg/pata). Entre os animais tratados com PGE₂, um grupo adicional tratado com indometacina (IND, 5 mg/kg, v.o) foi incluído. O limiar mecânico foi avaliado 3 h após a injeção do estímulo nociceptivo utilizando os filamentos de *von Frey*. Cada barra representa a média \pm E.P.M do limiar mecânico 50% (n=7-10). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo basal (##p<0.001 e ### p<0,001) ou em relação ao grupo tratado somente com V (*** p<0,001).

4.12 Efeito do bloqueio de canais de potássio sensíveis ao ATP sobre o efeito antinociceptivo do composto isolado

A figura 17 mostra que, conforme esperado, a aplicação local de PGE₂ reduziu o limiar mecânico de retirada da pata dos animais quando comparado ao limiar mecânico basal. O tratamento com a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona ou com o controle positivo dipirona, reduziu significativamente a hiperalgesia induzida pela PGE₂ (fig. 17). O pré-tratamento local da pata direita dos animais com a glibenclamida, um bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP reverteu significativamente o efeito nociceptivo da dipirona, mas não modificou o efeito do composto isolado (Fig.17).

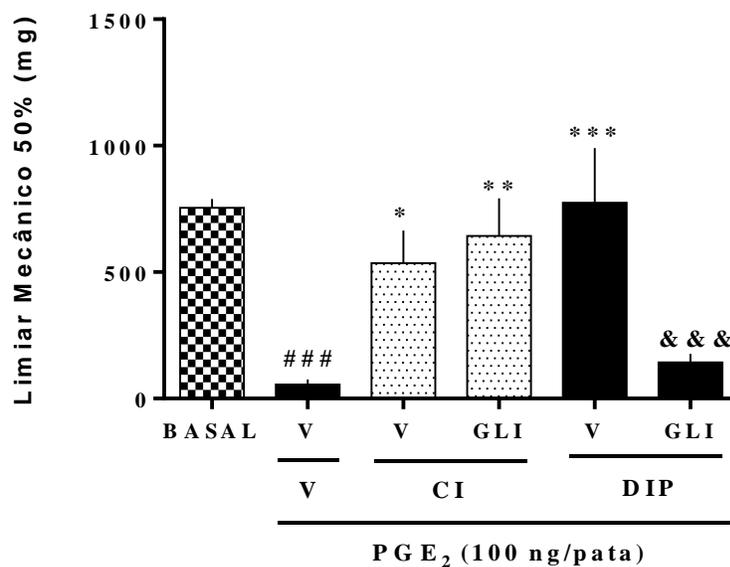


FIGURA 17: EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM GLIBENCLAMIDA SOBRE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO COMPOSTO ISOLADO. O limiar mecânico foi avaliado para cada animal (BASAL). Os animais foram então previamente tratados com glibenclamida (GLI, 80 μ g/pata) ou veículo (V, Tween 80 1%, 20 μ l/pata) e imediatamente após, os animais foram tratados com o composto isolado 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona (CI, 0,15 mg/Kg, v.o.) ou veículo (V, Tween 20 0.1%, v.o.) ou dipirona (DIP, 150 mg/Kg, v.o.). Uma hora após este tratamento, os animais receberam PGE₂ (100 ng/pata). O limiar mecânico foi avaliado 3 h após a injeção de PGE₂ utilizando os filamentos de *von Frey*. Cada barra representa a média \pm E.P.M do limiar mecânico 50% (n=6). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo basal (### p<0,001) ou em relação ao grupo V/V/PGE₂ (*p<0,05, **p<0,01 e *** p<0,001) ou em relação ao grupo V/DIP/PGE₂ (&&& p<0,001).

4.13 Efeito do composto isolado sobre a febre e sobre o aumento da concentração plasmática de citocinas induzido por LPS.

A administração da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona por via oral não promoveu alterações significativas na temperatura corporal dos animais. A administração i.p de LPS promoveu uma resposta febril que se iniciou 1,5 h após a injeção e permaneceu significativamente elevada até a quarta hora (Fig. 18). O tratamento dos animais com a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona (0,15 mg/Kg v.o.) inibiu o aumento da temperatura corporal de maneira similar à indometacina (5 mg/Kg, v.o) (Fig. 18).

Na figura 19 observamos que a administração do composto isolado não alterou os níveis basais de TNF- α , IL-1 β e de IL-6. A administração de LPS promoveu o aumento da concentração plasmática destas citocinas (Fig. 19). O tratamento dos animais com o composto isolado inibiu este aumento, de assim como a dexametasona, usada como controle positivo (Fig. 19).

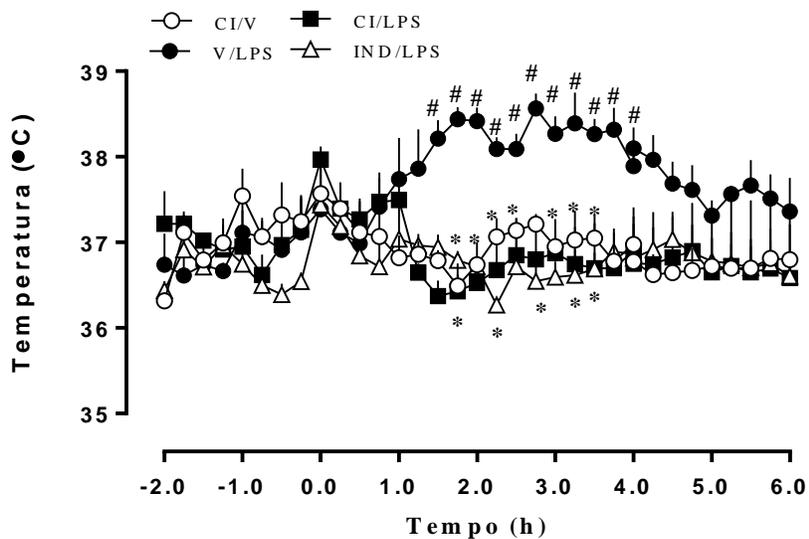


FIGURA 18: EFEITO DO COMPOSTO ISOLADO SOBRE A RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com o composto isolado 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona (CI, 0,15 mg/Kg, v.o.) ou o mesmo volume de veículo (V, Tween 20 1%) ou indometacina (IND, 5 mg/kg v.o.). Uma hora após tratamento oral, os animais receberam LPS (100 μ g/Kg i.p, tempo 0) ou veículo (V, salina) e a temperatura corporal foi avaliada por 6 h. Os pontos representam a média \pm E.P.M da temperatura corporal ($^{\circ}$ C) (n=6). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo CI/V (# $p < 0,05$) ou em relação ao grupo V/LPS (* $p < 0,05$).

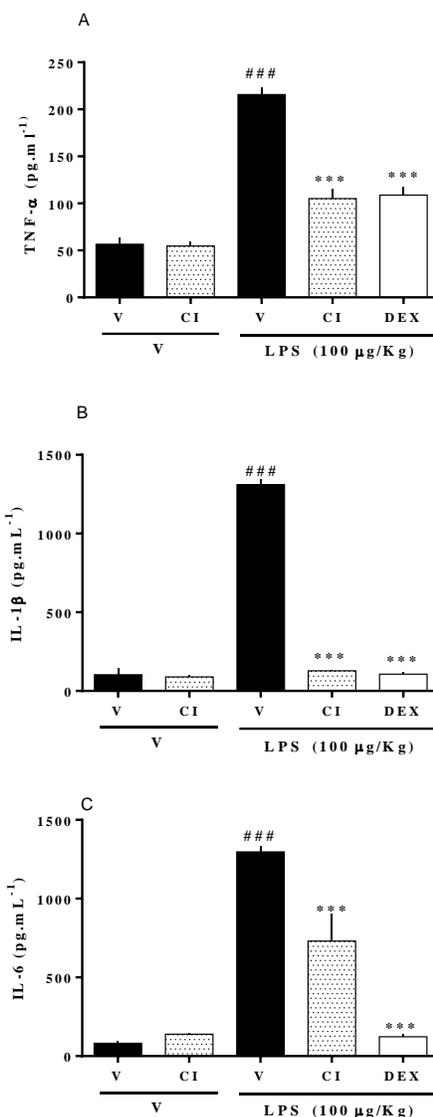


FIGURA 19: EFEITO DO COMPOSTO ISOLADO SOBRE O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF- α , IL-1 β e IL-6 INDUZIDA POR LPS EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com o composto isolado 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona (CI, 0,15 mg/Kg, v.o.) ou o mesmo volume de veículo (V, Tween 20 1%) ou com dexametasona (1 mg/kg, s.c.). Uma hora após tratamento por v.o. ou 30 min. após o tratamento s.c. os animais receberam LPS (100 μ g/kg) ou veículo (V, salina) por via i.p. Amostras de sangue foram coletas após 1 h para dosagem de TNF- α (painel A), 2 h para dosagem de IL-1 β (painel B) e 3 h para dosagem de IL-6 (painel C). As barras representam a média \pm E.P.M da concentração plasmática das citocinas em pg/ml (n=6). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V/V (### p<0,001) ou em relação ao grupo V/LPS (** p<0,01, *** p<0,001).

4.14 Efeito do tratamento local com o composto isolado sobre o edema de pata induzido pela carragenina.

A administração somente de veículo na pata esquerda do animal não promoveu alterações significativas no volume da pata dos animais (Fig. 20). A injeção de carragenina induziu a formação de edema, caracterizado pelo aumento significativo da espessura da pata. A formação do edema em resposta à injeção de carragenina teve seu início em 0,5 h, sendo que seu efeito permaneceu até a quarta hora. O tratamento local com o composto isolado (CI) nas doses de 150 e 500 pg/pata reduziu significativamente espessura da pata em todos os tempos avaliados não sendo estatisticamente diferente da dexametasona (Fig. 20). A dose de 50 pg/pata não reduziu a formação do edema (Fig. 20).

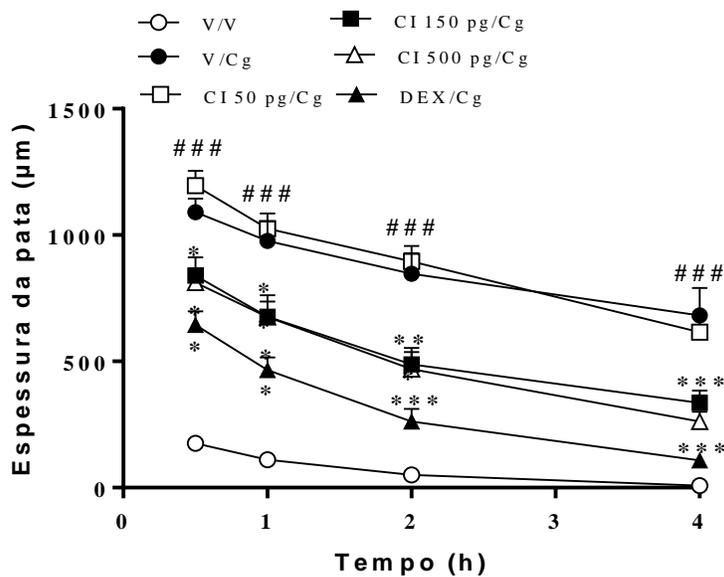


FIGURA 20: EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM O COMPOSTO ISOLADO SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com o composto isolado 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona (CI, 50, 150 e 500 μg), ou veículo (V, Tween 20 1%) ou Dexametasona (DEX, 1mg/kg, s.c.). A carragenina foi injetada 1 h após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo, por via i.pl. A pata contralateral recebeu apenas o mesmo volume de solução salina estéril (V). Cada ponto representa a média \pm E.P.M da variação da espessura da pata (em μm) (n=8). Os símbolos indicam significância estatística em relação ao grupo V/V (### $p < 0,001$) ou em relação ao grupo V/Cg (*** $p < 0,001$).

5 DISCUSSÃO

Este estudo com a naftoquinona 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona, isolada da fração hexânica do extrato bruto de *Sinningia canescens*, demonstra que este composto apresenta importante atividade biológica antiedematogênica, antinociceptiva e antipirética, e também que o seu mecanismo difere dos anti-inflamatórios clássicos, por reverter a hiperalgesia causada pela prostaglandina, mas não a causada pelo componente simpático. A ação antinociceptiva deste composto também independe da participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Este composto, pelo menos em parte, é o responsável por estas atividades observadas também no extrato bruto etanólico obtido de *S. canescens*.

Produtos naturais derivados de plantas representam uma importante fonte de novos compostos que podem ser efetivos contra várias doenças, incluindo as doenças inflamatórias (Newman, 2007). Vários compostos com interesse farmacológico foram isolados de plantas do gênero neotropical *Sinningia* (Verdan, 2014). Estudos anteriores já haviam identificado terpenóides, flavonoides, antraquinonas, cromenos e naftoquinonas neste gênero (Verdan, 2013).

Além disso, novos metabólitos secundários inéditos nesta espécie foram identificados, como a naftoquinona avaliada neste estudo. Estas classes de metabólitos podem exibir, entre outras ações farmacológicas, efeito anti-inflamatório e analgésico (Luo, 2010; Tessele, 2011).

Fitocompostos oriundos de espécies *Sinningia*, tem sido estudados pelo nosso grupo e por outros grupos de pesquisa nos últimos anos. Compostos isolados e identificados da *S. cardinalis* e *S. speciosa* mostraram relevante atividade anti-inflamatória (Verdan, 2009). Na *S. allogophylla*, a naftoquinona 8-metoxi-lapachenol, mostrou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, revertendo a hiperalgesia mecânica causada por diversos mediadores, como TNF- β , IL-1 β entre outros (Barbosa, 2013).

Um trabalho mais recente com a *S. aggregata* mostrou a atividade antinociceptiva do seu extrato e isolou a naftoquinona agregatina-D, que apresenta atividade antinociceptiva em doses inferiores em relação a doses usadas com outros analgésicos e também reverteu a hiperalgesia causada por

diversos mediadores, como a dopamina e a PGE₂ (Souza, 2015). Estes dados sugerem que plantas deste gênero possuem compostos interessantes que podem apresentar mecanismos de ação diferentes dos conhecidos anti-inflamatórios e analgésicos.

Apesar de a *S. canescens*, bem como outras plantas deste gênero, não terem indicação popular para o tratamento de doenças, a importante atividade mostrada por estudos anteriores com extratos de *Sinningia sp.* e compostos deles isolados, motivou a investigação pela atividade farmacológica nesta espécie.

Foi avaliado inicialmente o potencial antiedematogênico, no modelo de edema de pata induzido pela carragenina. Este é um modelo útil para mimetizar as mudanças vasculares associadas à inflamação, sendo que o pico de formação do edema ocorre nas primeiras horas após a injeção i.pl. de carragenina (Fletcher, 1997; Kayser, 1998; Perrot, 1998), havendo predominantemente infiltração de neutrófilos (Di Rosa, 1968).

A resposta inflamatória que se inicia imediatamente após a injeção de carragenina é um resultado da ação combinada de vários mediadores como histamina, bradicinina, serotonina e prostaglandinas (Vilela, 2010). O extrato bruto da *S. canescens* reverteu de maneira dose-dependente o edema induzido por carragenina. Este dado sugere que o extrato bruto poderia então estar inibindo a síntese ou a ação de um ou mais mediadores responsáveis pela formação do edema.

Verificada a atividade antiedematogênica e sabendo que a dor é um dos sinais que acompanham a inflamação, foi avaliado o potencial antinociceptivo do extrato bruto em diferentes modelos animais.

Os modelos de nocicepção são amplamente usados para identificar o potencial analgésico de novas substâncias. Estes testes são realizados pela injeção de um agente químico com propriedade irritante que induz comportamentos como contorção abdominal ou lambida da pata injetada. Estes agentes podem ser químicos, como o ácido acético (Koster et al., 1959) ou formalina (2,5 %), por exemplo (Dubuisson, 1977).

O primeiro modelo de nocicepção usado neste trabalho foi o de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, um modelo simples e pouco específico, mas que responde satisfatoriamente a várias drogas analgésicas (Koster, 1959). A nocicepção induzida pelo ácido acético depende da ativação de macrófagos peritoniais e de mastócitos e então da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β entre outras, além da subsequente síntese e liberação de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (Ribeiro, 2000). O extrato bruto foi testado neste modelo nas mesmas doses que reduziram o edema de pata e observamos que este extrato diminuiu significativamente o número de contorções abdominais sugerindo um possível efeito antinociceptivo. No entanto, como dito anteriormente, este modelo é pouco específico e para confirmar estes resultados, o extrato bruto foi testado em outros modelos de nocicepção.

Assim, outro modelo utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva foi o teste de nocicepção induzida pela formalina, que é um ensaio cuja resposta comportamental avaliada é mais elaborada, envolvendo uma organização supra-espinhal. A resposta nociceptiva deste teste é bifásica, sendo que após a injeção de formaldeído a 2,5% na pata traseira do animal (primeira fase, 5 min. iniciais), ocorre a direta ativação do nociceptor via TRPA1 e a liberação de serotonina, histamina e bradicinina (Hunskaar, 1987 ;Chichorro, 2004). Já a segunda fase (15-40 min) é mediada por citocinas como TNF- α , IL-1 β e prostaglandinas, sendo esta a fase inflamatória (Tjolsen, 1992). De fato a maioria das drogas anti-inflamatórias não esteroidais conhecidas reduzem apenas a segunda fase da resposta, por reduzirem a síntese de prostaglandinas. Nossos dados demonstram que o extrato bruto, nas mesmas doses que reduzem o edema e as contorções abdominais, diminuiu o tempo de lambida da pata (comportamento nociceptivo avaliado) na fase inflamatória do teste, mas não foi efetivo na primeira fase. Estes dados em conjunto reforçam a possibilidade de que este extrato apresente compostos com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

Sabendo da efetividade do extrato tanto no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, quanto da nocicepção induzida pela formalina, ambas as respostas de cunho inflamatório, o próximo passo foi avaliar se

este extrato poderia ser efetivo em uma das principais características da nocicepção de origem inflamatória, a hiperalgesia. Assim, a atividade anti-hiperalgésica do extrato foi testada no modelo de hiperalgesia mecânica induzido pela carragenina.

A carragenina induz hiperalgesia em camundongos que se inicia pela liberação de uma cascata de citocinas e quimiocinas que resultam na formação de prostanoídes e aminas simpatomiméticas (Cunha *et al*, 2005). Esta liberação de mediadores leva a uma sensibilização dos nociceptores (hiperalgesia) que resulta na resposta de retirada da pata após um estímulo mecânico como a aplicação de filamentos de *von Frey*. Esta metodologia foi extensivamente utilizada em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo (Mori, 2011 ;Barbosa *et al*, 2013 ;Souza *et al*, 2015), no qual utilizamos o paradigma do *up-down*, em que a massa dos filamentos testados oscilou próximo ao limiar de resposta do animal, permitindo a comparação entre o limiar basal de retirada com o limiar de retirada após a sensibilização (Dixon, 1980). Os resultados demonstram que o extrato bruto na dose de 30 mg/kg (dose efetiva nos modelos de contorções abdominais e de formalina) reverte a redução do limiar mecânico induzido por carragenina, resultado este que reforça o efeito anti-nociceptivo dos testes realizados anteriormente. É importante salientar que a hiperalgesia observada neste modelo é causada por mediadores comuns aos outros utilizados (Poole, 1999 ;Cunha *et al*, 2005). Estes dados sugerem, portanto, que o extrato bruto da *S. canescens* possui uma importante atividade anti-nociceptiva em modelos de nocicepção de origem inflamatória, possuindo uma importante atividade anti-hiperalgésica.

A observação de que o extrato não modificou a primeira fase da resposta induzida por formalina também sugeriu que este extrato não possuía uma ação sobre a nocicepção de origem não inflamatória. Para dar mais suporte a esta observação, avaliamos o efeito do extrato bruto de *S. canescens* na nocicepção térmica. Neste modelo, mediado pela ativação de fibras C e A δ , há ativação dos receptores vanilóides, que respondem à alta temperatura (Julius, 2001; Caterina *et al*, 1997). Observamos que o extrato bruto, ao menos na menor dose testada nos outros modelos de nocicepção, não tem ação antinociceptiva em um modelo que

não envolve uma resposta inflamatória, já que não aumentou o tempo de latência dos animais no modelo de placa quente, diferentemente do que foi observado com o fentanil, um opióide sintético. Portanto, este experimento mostra ainda que o extrato bruto não possui uma atividade semelhante aos opióides cujo mecanismo de ação envolve ações em receptores opioidérgicos tanto na medula espinhal como em regiões supraespinhais, dentre elas a substância cinzenta periaquedutal.

As respostas aos estímulos nociceptivos nos modelos utilizados dependem do bom desempenho motor. Deste modo, a dose de 30 mg/kg do extrato bruto, que foi a menor dose que mostrou importante efeito nociceptivo, foi também utilizada no teste do Rota Rod, para descartar que um eventual comprometimento do desempenho motor ou efeito relaxante muscular nos animais, o que levaria a uma interpretação errônea do efeito analgésico. Os animais tratados com o extrato bruto não apresentaram uma diminuição do desempenho motor neste teste enquanto que os animais tratados com diazepam (controle positivo) apresentaram significativa redução. Este resultado confirma que o extrato bruto diminui a nocicepção causada pela inflamação e não pelo fato no animal não responder devido ao comprometimento da atividade motora.

Muitos dos mediadores que estão presentes no edema e nos diferentes modelos de nocicepção são comuns e as citocinas são importantes para o desenvolvimento de ambas as respostas (Chichorro, 2004; Cunha *et al*, 2005; Valerio *et al*, 2007). Citocinas como o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6, quando são produzidas em quantidade suficiente e atingem a circulação, resultam em febre (Cannon, 1990). A febre somente ocorre então, apenas quando altas quantidades destas citocinas são produzidas, pois estes mediadores precisam atingir a área pré-óptica do hipotálamo anterior para então induzir mediadores centrais (Bastos-Pereira *et al*, 2014; Bastos-Pereira *et al*, 2015; Reis *et al*, 2011) que possam alterar o controle da temperatura corporal exercido nesta área (Kluger, 1991). Especificamente, a febre induzida por LPS é mediada por pirógenos endógenos, sendo que as principais citocinas que agem como pirógenos endógenos neste modelo são a IL-1 β , IL-6 e o TNF- α , sendo o TNF- α a primeira a ser formada

(Kluger, 1991). Assim, o potencial antipirético do extrato bruto e seu efeito sobre a concentração plasmática de TNF- α induzido por LPS foram avaliados.

A administração do extrato bruto foi capaz de inibir o aumento da temperatura corporal induzido pela administração de LPS de forma similar à indometacina. Além disso, esta dose impediu o aumento da concentração plasmática de TNF- α induzida por LPS. Portanto, é possível que a redução da síntese/liberação de TNF- α esteja diretamente relacionada ao efeito antipirético do extrato uma vez que o protocolo utilizado para avaliação destes dois parâmetros foi o mesmo. A dose de 10 mg/kg do extrato bruto também foi efetiva em diminuir a concentração plasmática de TNF- α . Não testamos se esta dose também seria capaz de inibir a resposta febril, pois nesta fase do estudo estávamos mais interessados em verificar a atividade do extrato bruto mais do que seu mecanismo de ação. No entanto, esta dose não foi efetiva nos testes de nocicepção (não resultou em reduções significativas). É possível que a participação do TNF- α nos modelos de contorções abdominais por ácido acético e formalina seja menos relevante do que no modelo de febre induzida por LPS, embora já esteja bem caracterizada (Alves-Filho *et al.*, 2010)

Os extratos brutos de plantas podem apresentar atividade farmacológica, entretanto são constituídos por uma mistura muito complexa de compostos ativos, parcialmente ativos e componentes inativos (Heinrich, 2010). Isto justifica sua partição em solventes orgânicos de diferentes polaridades, com a intenção de se isolar e identificar apenas os componentes ativos de interesse. Além disso, a presença de alguns componentes no extrato bruto pode interferir na sua atividade farmacológica, aumentando ou diminuindo a sua eficácia sendo, portanto, necessário que a purificação seja acompanhada da análise por CLAE, prevenindo assim a perda de compostos com atividade farmacológica (Picker *et al.*, 2014). Com este objetivo, o extrato bruto foi particionado em quatro solventes orgânicos (BUT, AcEt, DCM e HEX). Todas as frações foram testadas, sendo suas doses baseadas nos seus respectivos rendimentos, tanto no modelo do edema de pata quanto na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina.

Verificou-se assim, que a atividade farmacológica do extrato bruto se concentrava nas frações DCM e HEX. Ambas as frações, também reverteram a febre induzida pelo LPS. Como estas frações possuem uma composição química bastante parecida, uma naftoquinona encontrada majoritariamente, a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona, foi isolada e caracterizada.

Naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza e são análogas da vitamina K₁, sintetizada por plantas. O efeito destes compostos já vem sendo estudado e já foi demonstrada a atividade antioxidante e anti-inflamatória de outras naftoquinonas. Compostos como a menadiona (vitamina K₃), o plumbagim e o shikonin (Luo, 2010) inibem a ativação do NF- κ B, e a acumulação da subunidade p65 no núcleo, em macrófagos estimulados por LPS. Estes estudos mostram também a habilidade destes compostos em inibir a síntese de citocinas por inibirem diferentes quinases, como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Tessele, 2011).

A 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona, composto majoritário tanto na fração DCM quanto na fração HEX foi isolada e quando administrada tanto por via oral, quanto diretamente na pata, inibiu a formação do edema induzido por carragenina. Particularmente após a administração diretamente na pata dos animais, esta naftoquinona apresentou atividade antiedematogênica. Este resultado sugere que este composto contribui para a ação anti-inflamatória observada no extrato bruto e nas frações DCM e HEX. Ainda, este resultado corrobora com os dados anteriores, de não alterar nem o desempenho motor nem o tempo de latência na placa quente, sugerindo a ação local da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona. Como muitos anti-inflamatórios usados na clínica apresentam efeitos colaterais, assim, novos compostos de origem natural que agem diretamente no tecido inflamado tem sido preferencialmente estudados para o desenvolvimento de drogas, com menor risco associado ao uso.

Como a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina resulta na liberação de prostaglandinas e de aminas simpáticas (Cunha, 2005) foi avaliado o efeito da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona em reverter a hiperalgesia mediada por estes componentes finais. A PGE₂, quando administrada na pata dos

camundongos diminuiu o limiar mecânico de retirada da pata. A PGE_2 é um prostanóide estável usualmente sintetizado no local da inflamação. Este prostanóide age diretamente no terminal periférico de nociceptores aferentes primários aumentando a amplitude das correntes dos canais de sódio resistentes a tetrodotoxina (TTX-R) diminuindo o limiar de excitabilidade e aumentando o número de potenciais de ação (Taiwo, 1991). Os TTX-R são canais de sódio dependentes de voltagem compreendidos pelo Na_v 1.8 e pelo Na_v 1.9. Além disso, a ativação da PKA pela PGE_2 aumenta a expressão destes canais Na_v 1.8 na superfície celular (Liu, 2010) e a hiperalgesia causada é mediada pela via de sinalização adenilato ciclase/AMPc/PKA (Aley, 1999). A ativação desta via ainda é dependente de um conjunto específico de integrinas (α 1, α 3 e β 1) (Dina *et al.*, 2005). Este conjunto de integrinas é importante para facilitar a ativação da adenilato ciclase, que ocorre após a estimulação do receptor de prostaglandina.

Sabe-se que a hiperalgesia induzida pelo agonista da PKC_ϵ , pseudo ϵ RACK, bem como a que é induzida pelo componente simpático da dor, como a dopamina, depende das sub-unidades de integrinas α 5 e α 3 contrastando com as subunidades α 1, α 3 que são recrutadas na hiperalgesia induzida pela PGE_2 (Dina *et al.*, 2005). A isoforma PKC_ϵ , particularmente, é importante para promover sensibilização do nociceptor causada pela inflamação. Esta isoforma também está envolvida em mecanismos de adesão celular. Durante o processo inflamatório, as plaquetas interagem com os neutrófilos e promovem assim o recrutamento de células (Hidalgo, 2009). Neutrófilos expressam basicamente as integrinas β 1 e β 3 e monócitos as integrinas β 1 e β 2 (Herter, 2013). Assim, além do seu papel na nocicepção, este conjunto de proteínas tem muitos outros papéis biológicos sendo muito importantes na modulação da resposta inflamatória. A ação anti-hiperalgésica do composto não foi alterada pelo pré-tratamento dos animais com o bloqueador não seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP glibenclamina, sugerindo que não há a participação destes canais nesta resposta.

Assim, embora estes dois componentes, prostaglandinas e aminas simpáticas induzam hiperalgesia dependentes de AMP_c , os componentes

intracelulares envolvidos nesta ativação são diferentes. Já a hiperalgesia causada pelo AMP_c (ou seu análogo dibutilil AMP_c) não depende destas integrinas.

A 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona foi capaz de rever a hiperalgesia induzida pela PGE₂, mas não foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pelo análogo permeável do AMP_c, dbAMP_c. Além disso, esta naftoquinona não reverteu a hiperalgesia causada pela dopamina. Estes resultados sugerem que a atividade antinociceptiva deste composto esteja relacionada a estes componentes diferenciais, particularmente às quinases envolvidas nestes processos e aos conjuntos de subunidades de integrinas que podem estar sendo inibidos ou impedidos de se agruparem, já que subunidades comuns de integrinas regulam tanto a migração celular quanto a nocicepção induzida pela prostaglandina E₂, no entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Esta possível interação da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona com quinases específicas e integrinas pode também ser responsável pelos resultados que discutiremos a seguir.

O composto isolado também não alterou a temperatura corporal dos animais. Este dado é importante porque drogas antipiréticas como o ácido acetil-salicílico e a indometacina não reduzem a temperatura corporal em condições normais (Zampronio *et al.*, 1995). Ainda, o composto possui efeito antipirético, impedindo a febre induzida pelo LPS. Estes dados em conjunto sugerem que a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona é responsável pelo efeito anti-inflamatório, antinociceptivo e antipirético observado no extrato bruto e frações da *S. canescens*. Não podemos, no entanto, descartar que outros compostos presentes neste extrato possam contribuir também para estes efeitos uma vez que estes compostos não foram avaliados.

A estimulação térmica de macrófagos resulta na ativação de um fator específico regulador da transcrição, o fator do choque térmico 1 (HSF-1). Este fator, no caso de fatores envolvidos na resposta inflamatória incluindo TNF- α e IL-1 β , pode reprimir a transcrição de genes (Singh, 2000). O estímulo do LPS, entretanto, diminui a atividade do HSF-1 permitindo assim, a transcrição de genes pró-inflamatórios (Xiao, 1999). O TNF- α é a primeira citocina produzida em resposta ao LPS, e sabendo que esta citocina induz a síntese de IL-1 β que induz

sua própria síntese e a de IL-6, que são pirógenos endógenos que em última análise leva a síntese de prostaglandinas no sistema nervoso central e à resposta febril (Kluger, 1991, Bastos-Pereira, 2015). Foi testado o efeito do tratamento com a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona no aumento da concentração plasmática destas citocinas induzidas pelo LPS. Notavelmente, o composto isolado diminuiu a concentração destas citocinas após o estímulo com LPS. Assim, pelo menos em parte, o efeito antipirético do composto isolado pode estar relacionado à redução da síntese destes pirogênicos endógenos.

Embora os resultados de inibição da síntese e liberação de citocinas tenham sido obtidos no modelo de LPS, é possível que este efeito da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona sobre a síntese de citocinas se estenda aos modelos inflamatórios de carragenina (edema e hiperalgesia) uma vez que os mediadores envolvidos nestas respostas são os mesmos.

No edema já foi demonstrado que o TNF- α é um importante mediador e esta citocina induz a subsequente liberação de cininas e leucotrienos (Tonussi e Ferreira, 1999). O edema induzido pela administração da carragenina resulta no aumento da expressão de enzimas como COX-2 e NOS₂.

O TNF- α , e outros mediadores pró-inflamatórios como a IL-1 β e IL-6, produzidos durante a resposta inflamatória periférica por células neuronais ou não, também aumentam a sensibilidade à dor (Sorkin et al, 1997; Sommer et al, 2004). Esta sensibilização periférica tem como elementos-chave a produção destas citocinas. Estas citocinas aumentam a atividade do receptor TRPV1 (Nicol, 1997; Jin, 2006) e aumentam a expressão de genes pró-nociceptivos, como mRNA de COX-2 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (Fehrenbacher, 2005; von Banchet, 2005), fazendo com que haja um aumento espontâneo da atividade destes neurônios (Schafers, 2003). Além disso, estas citocinas também aumentam a sensibilidade à dor através de um mecanismo central, já que sua produção é induzida na medula espinhal durante diferentes condições dolorosas, bem como a sua administração intratecal também induz hiperalgesia e seu bloqueio na medula também atenua esta resposta (DeLeo et al, 2001). Esta sensibilização central está diretamente relacionada ao aumento na transmissão sináptica excitatória e a

diminuição da transmissão sináptica inibitória (Moore, 2002). Estas citocinas são produzidas no sistema nervoso central por células da glia, como astrócitos e micróglia, durante a inflamação. Foi demonstrado que o TNF- α produz um grande aumento na transmissão sináptica e na atividade dos neurônios da lamina II do corno dorsal (DeLeo et al, 2001). Dados sugerem o aumento de 71% na frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias, sendo esta citocina uma potente indutora da liberação de glutamato. A IL-1 β age de maneira sinérgica, aumentando estas correntes excitatórias (Guo et al, 2007), e também, juntamente com a IL-6, diminuindo a neurotransmissão inibitória e suprimindo correntes neuronais induzidas pelo ácido gama-aminobutírico e pela glicina (Kawasaki et al, 2008). A inibição da produção e da ação do TNF- α já é usada como mecanismo para tratar a dor, e explica o mecanismo de analgesia de drogas como a talidomida (Huang, 2014) entre outras.

A indução da síntese destas citocinas por LPS depende da ativação de TLR4. A ativação deste receptor é dependente do gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MYD88) e requer a Proteína Adaptadora que contém o domínio TIR (Lizarte *et al.*) e levam a ativação de uma cascata de quinases, entre elas a IK β quinase (IKK), a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), serinotreonina quinase de interação com o receptor-1 (RIP-1) e a quinase de ligação a TANK-1 (TBK-1) (Parker *et al.*, 2007). Essas vias tem como resultado comum a regulação principalmente do fator nuclear κ B (NF κ B). O resultado desta ativação é a produção de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas e enzimas (Piras e Selvarajoo, 2014; Broz, 2013)

Deste modo, a síntese de citocinas, assim como a ação hiperalgésica da PGE₂ citada anteriormente, também é dependente de quinases. Portanto é possível que a 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona possa estar inibindo a ativação de quinases específicas envolvidas tanto na sinalização celular ativada por PGE₂ quanto na síntese de citocinas por LPS. Esta hipótese será objeto de estudos futuros.

De maneira geral, os resultados apresentados neste estudo mostram então, que o extrato etanólico da *S. canescens*, bem como suas frações diclorometano e

hexano possuem atividade antiedematogênica, antinociceptiva e antipirética importante, inibindo ainda a síntese de citocinas induzidas pelo LPS. Pelo menos em parte, estas ações se devem a presença no extrato da 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona, uma naftoquinona que possui inclusive um efeito anti-inflamatório local. Estas ações podem estar relacionadas a uma característica comum às naftoquinonas de inibir a ativação o fator de transcrição NF- κ B, agindo em subunidades específicas da sinalização intracelular mediada por proteínas quinases, comuns às respostas estudadas, embora esta hipótese necessite de maiores estudos.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que o extrato bruto de *Sinningia canescens*, suas frações diclorometano e hexano e o composto isolado, a naftoquinona 6-metoxi-7-hidroxi- α -duniona, apresentam atividade antiedematogênica, antinociceptiva, anti-hiperalgésica e antipirética. Tanto o extrato bruto quanto o compostos isolado foram capazes de impedir o aumento da concentração plasmática de citocinas, induzida pelo LPS.

Este estudo também mostra que o extrato bruto não causa sedação nem diminuição da atividade motora dos camundongos, possuindo efeito local. O composto isolado foi capaz de reverter a hiperalgesia causada pela carragenina e pela prostaglandina E₂, mas não reverteu a hiperalgesia causada pela dopamina e pelo dbAMPc.

O mecanismo antinociceptivo desta naftoquinona não depende da ativação dos canais de potássio sensíveis ao ATP.

Sugerimos que estas ações descritas devem-se pela inibição de quinases envolvidas nestas respostas, entretanto mais estudos são necessários para se confirmar esta hipótese, sendo ainda necessário testa a toxicidade nas doses utilizadas.

REFERÊNCIAS

ALVES-FILHO, J. C. et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nat Med**, v. 16, n. 6, p. 708-12, Jun 2010. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking).

BAKER, C. C. et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, n. 2, p. 331-5, Aug 1983. ISSN 0039-6060 (Print) 0039-6060 (Linking).

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci**, v. 14, n. 12, p. 436-41, Dec 1993.

BECKER, C. G.; NACHMAN, R. L. Contractile proteins of endothelial cells, platelets and smooth muscle. **Am J Pathol**, v. 71, n. 1, p. 1-22, Apr 1973.

BLATTEIS, C. M. et al. Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. **Brain Res Bull**, v. 11, n. 5, p. 519-26, Nov 1983.

BRAY, M. A. Leukotriene B4: an inflammatory mediator with vascular actions in vivo. **Agents Actions Suppl**, v. 11, p. 51-61, 1982.

CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 77-92, Oct 5 2006. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking).

CAMPOS, M. M.; SOUZA, G. E. P.; CALIXTO, J. B. In vivo B(1) kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor κ B pathways. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 8, p. 1851-1859, 1999. ISSN 0007-1188.

CANNON, J. G. Perspective on fever: the basic science and conventional medicine. **Complement Ther Med**, v. 21 Suppl 1, p. S54-60, Apr 2013. ISSN 1873-6963 (Electronic) 0965-2299 (Linking).

COELHO, M. M. et al. Multiple mechanisms mediate antipyretic action of glucocorticoids. **American Journal of Physiology**, v. 269, n. 3 Pt 2, p. R527-35, Sep 1995.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb 1 2005. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

DINA, O. A. et al. Primary afferent second messenger cascades interact with specific integrin subunits in producing inflammatory hyperalgesia. **Pain**, v. 115, n. 1-2, p. 191-203, May 2005. ISSN 0304-3959 (Print)
0304-3959 (Linking).

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Rev Infect Dis**, v. 6, n. 1, p. 51-95, Jan-Feb 1984.

_____. Thermoregulation and the pathogenesis of fever. **Infect Dis Clin North Am**, v. 10, n. 2, p. 433-49, Jun 1996.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 21, n. 2, p. 341-3, 1988. ISSN 0100-879X (Print)
0100-879X (Linking).

ENGELHARDT, G. et al. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. **Inflamm Res**, v. 44, n. 10, p. 423-33, Oct 1995. ISSN 1023-3830 (Print)
1023-3830 (Linking).

FABRICIO, A. S. et al. Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. **Br J Pharmacol**, v. 125, n. 3, p. 542-8, Oct 1998. ISSN 0007-1188 (Print)
0007-1188 (Linking).

FENG, L. et al. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. **J Clin Invest**, v. 95, n. 4, p. 1669-75, Apr 1995.

FLOWER, R. J.; ROTHWELL, N. J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol Sci**, v. 15, n. 3, p. 71-6, Mar 1994.

FRAGA, D. et al. Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB1 receptors. **Br J Pharmacol**, v. 157, n. 8, p. 1494-501, Aug 2009. ISSN 1476-5381 (Electronic)
0007-1188 (Linking).

GALLIN, J.; GOLDSTEIN, I.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. 2nd edition. New York: Raven Press Ltd, 1992. 1-4

GILLOOLY, J. F. et al. Effects of size and temperature on metabolic rate. **Science**, v. 293, n. 5538, p. 2248-51, Sep 21 2001. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking).

GOPPELT-STRUEBE, M.; WOLTER, D.; RESCH, K. Glucocorticoids inhibit prostaglandin synthesis not only at the level of phospholipase A2 but also at the level of cyclo-oxygenase/PGE isomerase. **Br J Pharmacol**, v. 98, n. 4, p. 1287-95, Dec 1989.

HELLE, M. et al. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. **Eur J Immunol**, v. 18, n. 6, p. 957-9, Jun 1988.

JANCAR, S. et al. PAF induces rat plasma extravasation and releases eicosanoids during anaphylaxis. **Inflammation**, v. 15, n. 5, p. 347-54, Oct 1991.

JOENSUU, J. T. et al. The cost-effectiveness of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119683, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking).

KASSUYA, C. A. et al. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 124, n. 3, p. 369-76, Jul 30 2009. ISSN 1872-7573 (Electronic)
0378-8741 (Linking).

KEAHEY, T. M.; INDRISANO, J.; KALINER, M. A. Dissociation of cutaneous vascular permeability and the development of cutaneous late-phase allergic reactions. **J Allergy Clin Immunol**, v. 83, n. 3, p. 669-76, Mar 1989.

KLINE, R. H. T.; WILEY, R. G. Spinal mu-opioid receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception and morphine antinociception. **J Neurosci**, v. 28, n. 4, p. 904-13, Jan 23 2008.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev**, v. 71, n. 1, p. 93-127, Jan 1991. ISSN 0031-9333 (Print)
0031-9333 (Linking).

KNUEFERMANN, P. et al. CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. **Respir Res**, v. 8, p. 72, 2007.

LIZARTE, F. S. et al. Chronic alcoholism associated with diabetes impairs erectile function in rats. **BJU Int**, v. 105, n. 11, p. 1592-7, Jun 2010. ISSN 1464-410X (Electronic)
1464-4096 (Linking).

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 31 2008. ISSN 1872-6623 (Electronic)
0304-3959 (Linking).

LONG, N. C. et al. Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. **American Journal of Physiology**, v. 259, n. 4 Pt 2, p. R724-8, Oct 1990.

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

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991.

NAKANO, T.; ARITA, H. Enhanced expression of group II phospholipase A2 gene in the tissues of endotoxin shock rats and its suppression by glucocorticoid. **FEBS Lett**, v. 273, n. 1-2, p. 23-6, Oct 29 1990.

PARKER, L. C.; PRINCE, L. R.; SABROE, I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. **Clin Exp Immunol.**, v. 147, n. 2, p. 199-207., 2007.

PIKOULIS, E. A. et al. Trauma Management in Ancient Greece: Value of Surgical Principles through the Years. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 4, p. 425-430, 2004/04/01 2004. ISSN 0364-2313.

PIRAS, V.; SELVARAJOO, K. Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling. **Front Immunol**, v. 5, n. 70, 2014.

REIS, R. C. et al. Central substance P NK receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1beta and CCL3/MIP-1alpha in rats. **Brain Res**, v. 1384, p. 161-9, Apr 12 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking).

ROMANO, M. et al. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation. **European Journal of Pharmacology**, n. 0, 2015. ISSN 0014-2999.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front Biosci**, v. 10, p. 2193-216, 2005. ISSN 1093-9946 (Print) 1093-4715 (Linking).

SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, v. 220, n. 4597, p. 568-75, May 6 1983.

SAUTEBIN, L. et al. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 2, p. 323-8, Jan 1995.

SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 25, p. 12013-7, Dec 6 1994.

SVENSSON, C. I.; YAKSH, T. L. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 553-583, 2002 2002. ISSN 0362-1642.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Tumour necrosis factor-alpha mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain.**, v. 82, n. 1, p. 81-7., 1999.

USCHAKOV, A. et al. Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. **Neuroscience**, v. 150, n. 1, p. 104-20, Nov 30 2007. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking).

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am J Med**, v. 104, n. 3A, p. 2S-8S; discussion 21S-22S, Mar 30 1998.

VERDAN, M. H. et al. Chemical Constituents from *Sinningia canescens* and *S. warmingii*. **Nat Prod Commun**, v. 9, n. 10, p. 1535-7, Oct 2014. ISSN 1934-578X (Print) 1555-9475 (Linking).

WILLIAMS, T. J. Vascular permeability changes induced by complement-derived peptides. **Agents Actions**, v. 13, n. 5-6, p. 451-5, Aug 1983.

ZAMPRONIO, A. R. et al. Interleukin (IL)-6 release and fever induced by a pre-formed pyrogenic factor (PFPF) derived from LPS-stimulated macrophages. **Eur Cytokine Netw**, v. 11, n. 4, p. 589-96, Dec 2000. ISSN 1148-5493 (Print) 1148-5493 (Linking).

ZAMPRONIO, A. R. et al. Indomethacin blocks the febrile response induced by interleukin-8 in rabbits. **Am J Physiol**, v. 269, n. 6 Pt 2, p. R1469-74, Dec 1995. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking).

ZUCKERMAN, S. H.; SHELLHAAS, J.; BUTLER, L. D. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis: effects of endogenous and exogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-adrenal axis. **Eur J Immunol**, v. 19, n. 2, p. 301-5, Feb 1989.

ANEXOS

Soluções

- Tampão TRIS 1 M pH 8,0

TRIS.....121,11 g

Água destilada.....q.s.p 1L

pH ajustado para 8,0 com HCl 1N.

- Solução-mãe Salina Tamponada com Fosfatos (PBS)

NaCl.....80 g

KCl.....2 g

Na₂PO₄.....14,4 g

KH₂PO₄.....2 g

Diluir em água mili-Q e ajustar o pH para 7,2. Para uso diluir 10 x.

- Tampão Lavagem para ELISA

PBS.....1 L

Tween 20.....50 µl

- Tampão de Bloqueio para ELISA

Albumina bovina.....0,5 g

Sacarose.....2,5 g

Diluir em 50 ml de PBS. Se for armazenar adicionar 0,025 g de NaN_3 .

- Tampão de diluição para ELISA

NaCl0,877 g

TRIS-Cl.....0,242 g

Dissolver em 90 ml de água Mili-Q e ajustar o pH para 7,3. Adicionar 0,1 g de albumina bovina e 50 μl de Tween 20. Acertar o volume para 100 ml com água Mili-Q

- Solução para estreptoavidina

Estreptoavidina (1:250)

Albumina Bovina.....0,11 g

Diluir em 11 ml de PBS.

- Tampão Fosfato-citrato 0,05 M para oPD

Na_2PO_42,839 g

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$1,921 g

Diluir em 40 ml de água Mili-Q e acertar o pH para 5,0. Completar com água Mili-Q para 100 ml.

- Ácido Sulfúrico 3 M

H_2SO_415,99 ml

Água.....q.s.p 100 ml

- Ácido Clorídrico 1 N

HCl..... 8,3 ml

Água.....100 ml