



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

TALITA MAGALHÃES ROCHA

Formulação farmacêutica à base de epiisopiloturina, alcaloide de *Pilocarpus microphyllus*, reduz a hipernocicepção inflamatória: papel da via NO/GMPc/PKG/K⁺_{ATP} e modulação da resposta imune

FORTALEZA

2021

TALITA MAGALHÃES ROCHA

Formulação farmacêutica à base de epiisopiloturina, alcaloide de *Pilocarpus microphyllus*, reduz a hipernocicepção inflamatória: papel da via NO/GMPc/PKG/K⁺_{ATP} e modulação da resposta imune

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R577f Rocha, Talita.
Formulação farmacêutica à base de epiisopiloturina, alcaloide de *Pilocarpus microphyllus*, reduz a hipernocicepção inflamatória: papel da via NO/GMPc/PKG/K+ATP e modulação da resposta imune / Talita Rocha. – 2021.
110 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

1. Alcaloides . 2. Jaborandi . 3. Nociceptividade . 4. Citocinas . 5. Óxido Nítrico. I. Título.

CDD 615.1

TALITA MAGALHÃES ROCHA

Formulação farmacêutica à base de epiisopiloturina, alcaloide de *Pilocarpus microphyllus*, reduz a hipernocicepção inflamatória: papel da via NO/GMPc/PKG/K⁺_{ATP} e modulação da resposta imune

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará – UFC
Orientadora

Dra. Cristina Dislich Ropke
Phytobios Pesquisa Desenvolvimento e Inovação Ltda

Prof. Dr. David Fernandes Lima
Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

Prof. Dr. Lucas Antonio Duarte Nicolau
Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr

Profa. Dra. Vilma de Lima
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua infinita graça me permitiu chegar até aqui, suprimindo minhas necessidades e me fortalecendo para conseguir vencer as barreiras que surgiram, incluindo uma pandemia.

Aos meus pais Hilça Terceiro e José Freires pelo apoio, carinho, compreensão e incentivo. Sem vocês mais essa etapa da vida não seria vencida. Obrigada por tudo!!!

Ao meu noivo Caio Dias por estar sempre ao meu lado me incentivando e apoiando, pela sua compreensão e amor.

À minha orientadora Prof^a Kalyne Leal pelo seu acolhimento desde o início da minha graduação, orientação, suporte, ensinamentos e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus colegas e amigos do CEFAC, nesses 12 anos foram tantos e tão importantes que para não esquecer ninguém agradeço “geral” pelos momentos memoráveis, longos experimentos, cafezinhos e por tornarem essa jornada mais fácil e agradável.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por terem contribuído para minha formação profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA À BASE DE EPIISOPILOTURINA, ALCALOIDE DE *Pilocarpus microphyllus*, REDUZ A HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA: PAPEL DA VIA NO/GMPC/PKG/K⁺_{ATP} E MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE. Aluna: Talita Magalhães Rocha. Orientador: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2021.

Epiisopiloturina (EPI) é um alcaloide imidazólico obtido do resíduo industrial gerado pela extração de pilocarpina das folhas de *Pilocarpus microphyllus*, conhecida popularmente como jaborandi. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da epiisopiloturina (EPI) e formulação farmacêutica (Gotas EPI) em modelos experimentais de nocicepção aguda e persistente com descrição do possível mecanismo de ação. Para tanto, foi utilizado o método de pressão crescente na pata dos animais através do Von Frey eletrônico para avaliar hipernocicepção mecânica induzida por carragenina (Cg), epinefrina ou adjuvante completo de Freund (CFA). Foram utilizados camundongos Swiss (n = 5-8 / grupo, 25-30g). Inicialmente, avaliou-se o efeito da EPI nas formas sal e base (0,5 a 50 mg/kg, v.o.) na hipernocicepção inflamatória induzida por Cg (300 µg/pata) e a avaliação ocorreu em 1, 3 e 5h após a administração da Cg. Avaliando o uso racional dessa molécula, a forma e a dose escolhida para seguir o estudo foi a EPI base na dose de 1 mg/kg que reduziu 50,13% a hipernocicepção mecânica e a migração neutrofílica mensurada pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em aproximadamente 45% no tecido subplantar. Esse efeito mostrou-se relacionado com a modulação da produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC e IL-10). Para avaliar a participação da via NO/GMPC/PKG/K⁺_{ATP}, foram administrados, previamente ao tratamento com EPI, os inibidores da NOS (L-NAME, 30 mg/kg, i.p.), do GMPC (ODQ, 10 mg/kg, i.p.), da PKG (KT5823, 0,5 µg/pata) ou bloqueador dos canais de K⁺_{ATP} (glibenclamida, 5 mg/kg, i.p.), que reverteram significativamente hipernocicepção mecânica, mostrando assim a participação dessa via no efeito antinociceptivo da EPI. Na hipernocicepção mecânica induzida por epinefrina (100 ng/pata), o tratamento com EPI (1, 5 e 10 mg/kg, v.o.) reduziu a hipernocicepção em até 52,2%. No modelo de dor persistente induzida por CFA, a hipernocicepção mecânica e o edema de pata foram avaliados durante 7 dias. Animais foram tratados com salina (controle, v.o.); EPI (1, 5 e 10 mg/kg, v.o.) e dexametasona (5 mg/kg, v.o.) diariamente antes e após a administração de CFA (20 µL/pata, i.pl, administração única, dia 0). No 7º dia, o tecido subplantar foi coletado para quantificação de citocinas, atividade da MPO, expressão da enzima iNOS (Western blotting), bem como a coleta de tecido/estômago, para avaliar efeito da EPI sobre a mucosa gástrica. A administração diária de EPI reduziu a hipernocicepção mecânica, o edema de pata, a migração neutrofílica, a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) e a expressão de iNOS não associados à danos na mucosa gástrica, bem como ao desenvolvimento de tolerância. A formulação líquida oral à base de epiisopiloturina (Gotas EPI) mostrou incremento de 40% no efeito antinociceptivo quando comparado ao tratamento da EPI (Insumo Farmacêutico Ativo). Com base nos resultados obtidos, o efeito antinociceptivo da EPI está relacionado ao bloqueio no curso da sensibilização e ativação dos nociceptores pela ativação da via NO/GMPC/PKG/K⁺_{ATP} e também de forma indireta prevenindo a sensibilização dos nociceptores pela modulação da resposta imune/inflamatória. A formulação líquida a base de EPI (IFA), mostrou-se promissora para o tratamento da dor inflamatória aguda e persistente.

Palavras chave: Alcaloides, Jaborandi, Nociceptividade, Citocinas, Óxido Nítrico.

ABSTRACT

PHARMACEUTICAL FORMULATION BASED ON EPIISOPILOTURIN, ALKALOID FROM *Pilocarpus microphyllus*, REDUCES INFLAMMATORY HYPERNOCICEPTION: ROLE OF THE NO/GMPC/PKG/K⁺ATP ROUTE AND MODULATION OF THE IMMUNE RESPONSE. Author: Talita Magalhães Rocha. Advisor: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Doctoral thesis. Program of Pos-Graduate in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Federal University of Ceará, 2021.

Epiisopiloturine (EPI) is an imidazole alkaloid obtained from industrial waste generated by extracting pilocarpine from the leaves of *Pilocarpus microphyllus*, popularly known as jaborandi. Given the above, the aim of the present study was to investigate the effect of epiisopiloturine (EPI) and pharmaceutical formulation (EPI drops) in experimental models of acute and persistent nociception with description of the possible mechanism of action. For this purpose, the method of increasing pressure on the animals' paws through the electronic Von Frey was used to evaluate mechanical hypernociception induced by carrageenan (Cg), epinephrine or complete Freund's adjuvant (CFA). Swiss mice (n = 5-8 / group, 25-30g) were used. Initially, the effect of EPI in the salt and base forms (0.5 to 50 mg/kg, po) on inflammatory hypernociception induced by Cg (300 µg/paw) was evaluated and the evaluation occurred at 1, 3 and 5h after administration of Cg. Assessing the rational use of this molecule, the form and dose chosen to follow the study was the EPI based on a dose of 1 mg/kg which reduced 50.13% mechanical hypernociception and neutrophil migration measured by the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) in approximately 45% in the subplantar tissue. This effect was related to the modulation of the production of pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC, and IL-10). To assess the participation of the NO/cGMP/PKG/K⁺ATP pathway, NOS inhibitors (L-NAME, 30 mg/kg, ip), and cGMP (ODQ, 10 mg/kg, ip), PKG (KT5823, 0.5 µg/paw) or K⁺ATP channel blocker (glibenclamide, 5 mg/kg, ip), which significantly reversed mechanical hypernociception, thus showing the participation of this pathway in the effect antinociceptive of EPI. In mechanical hypernociception induced by epinephrine (100 ng/paw), treatment with EPI (1, 5 and 10 mg/kg, p.o.) reduced hypernociception by up to 52.2%. In the CFA-induced persistent pain model, mechanical hypernociception and paw edema were evaluated for 7 days. Animals were treated with saline (control, p.o.); EPI (1, 5 and 10 mg/kg, p.o.) and dexamethasone (5 mg/kg, p.o.) daily before and after administration of CFA (20 µL/paw, i.pl, single administration, day 0). On the 7th day, subplantar tissue was collected to quantify cytokines, MPO activity, iNOS enzyme expression (Western blotting), as well as tissue/stomach collection, to assess the effect of EPI on the gastric mucosa. Daily administration of EPI reduced mechanical hypernociception, paw edema, neutrophil migration, production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) and expression of iNOS not associated with gastric mucosal damage, as well as to the development of tolerance. The oral liquid formulation based on epiisopiloturine (EPI Drops) showed an increase of 40% in the antinociceptive effect when compared to the treatment of EPI (Active Pharmaceutical Ingredient). Based on the results obtained, the antinociceptive effect of EPI seems to be related to a block in the course of sensitization and activation of nociceptors by activating the NO/GMPC/PKG/K⁺ATP pathway and also indirectly preventing nociceptor sensitization through modulation of the immune/inflammatory response. The liquid formulation based on EPI (API), showed promise for the treatment of acute and persistent inflammatory pain.

Keywords: Alkaloid, *Pilocarpus microphyllus*, Nociception, Cytokines, Nitric Oxide.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Vias de processamento e modulação da dor.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2** Mecanismos envolvidos na dor inflamatória. ...**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3** Distribuição geográfica da espécie *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4** Representação da estrutura química da pilocarpina.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5** Representação da estrutura química da Epiisopilosina (A) e Epiisopiloturina (B).**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6** EPI cloridrato reduz hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg) em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7** EPI base reduz hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg) em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8** EPI reduz o número de células inflamatórias do tecido subplantar de camundongos após administração de carragenina.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9** EPI reduz a atividade da enzima MPO tecidual induzida por carragenina em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10** EPI reduz a liberação das citocinas pró-inflamatórias induzida por carragenina em camundongos, e promove a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 11.** Inibidor não-específico da óxido nítrico sintase (L-NAME) bloqueia o efeito de EPI na hipernocicepção induzida por Cg em camundongos. ..**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12** Inibidor seletivo da guanilato ciclase (ODQ) bloqueia o efeito da EPI na hipernocicepção induzida por Cg em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13** Inibidor da proteína quinase G (KT5823) bloqueia o efeito de EPI na hipernocicepção induzida por Cg em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 14** Bloqueador de canais de K⁺ sensíveis ao ATP (glibenclamida) inibe o efeito da EPI na hipernocicepção induzida por Cg em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 15** EPI reduz a hipernocicepção mecânica induzida por epinefrina em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**

- Figura 16** EPI reduz a hipernocicepção mecânica induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 17** EPI reduz edema de pata induzido por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 18** EPI reduz migração de neutrófilos induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 19** EPI reduz a liberação das citocinas pró-inflamatórias induzida por CFA em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 20.** EPI reduz a expressão de iNOS tecidual induzida por CFA em camundongos**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 21** O pré-tratamento dos animais com EPI durante sete dias não causa lesões na mucosa gástrica de camundongos tratados com CFA.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 22** Gotas EPI reduz hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg).**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 23** Gotas EPI reduz a atividade da enzima MPO tecidual induzida por carragenina em camundongos.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 24** Gotas EPI reduz modula a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias induzida por carragenina.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 25** Proposta para o mecanismo de ação antinociceptivo da epiisopiloturina (EPI) em modelo experimental de dor aguda.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição das Gotas EPI.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2 Resultados dos ensaios de qualidade das Gotas EPI.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3 Resultados da avaliação da estabilidade das Gotas EPI ...**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
Δ	Delta
°C	Grau(s) centígrado(s)
μL	Microlitro(s)
g	Gramma(s)
mg	Miligramma(s)
mL	Mililitro
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CFA	Adjuvante completo de Freund
COX	Cicloxigenase
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DAD	Arranjo de diodo
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
DTT	Ditiotreitol
EPM	Erro padrão da médio
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie relativa de oxigênio
fMLP	N-formilmetionil-leucil-fenilalanina
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HRP	Peroxidase de rábano

i.p.	intraperitoneal
i.pl.	intraplantar
IFA	Insumo farmacêutico ativo
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Iκb	Inibidor de kappa B
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
NaV	Canais iônicos de sódio regulados por voltagem
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-ona
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGE₂	Prostaglandina E ₂
pKa	Constante de acidez
PKA	Proteína quinase A

PKC	Proteína quinase C
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RIPA	Tampão de radioimunoprecipitação
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
TBST	Solução salina tamponada com tris (TBS) e Polissorbato 20
TMB	Tetrametil benzidina
TNBS	Ácido trinitrobenzenossulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRPA	Canal iônico de potencial receptor transiente
TRPV1	Receptores de potencial transitório do tipo vaniloide 1
U/L	Unidade por litro
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
1.1	Dor.....	Erro! Indicador não definido.
1.2	Fisiopatologia da dor	Erro! Indicador não definido.
1.3	Dor inflamatória	Erro! Indicador não definido.
1.3.1	Tratamento da dor inflamatória	Erro! Indicador não definido.
1.4	Plantas medicinais como fonte de fármacos.....	Erro! Indicador não definido.
1.4.1	Alcaloides de <i>Pilocarpus microphyllus</i> e a epiisopiloturina ...	Erro! Indicador não definido.
1.5	Desenvolvimento de formas farmacêuticas líquidas ..	Erro! Indicador não definido.
2	JUSTIFICATIVA	Erro! Indicador não definido.
3	OBJETIVOS.....	Erro! Indicador não definido.
3.1	Geral	Erro! Indicador não definido.
3.2	Específicos.....	Erro! Indicador não definido.
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
4.1	Aspectos éticos	Erro! Indicador não definido.
4.2	Animais.....	Erro! Indicador não definido.
4.3	Material de estudo	Erro! Indicador não definido.
4.4	Substâncias químicas.....	Erro! Indicador não definido.
4.5	Avaliação da Hipernocicepção: Pressão crescente na pata (Von Frey eletrônico)	Erro! Indicador não definido.
4.6	Hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg)	Erro! Indicador não definido.
4.6.1	Análise histopatológica	Erro! Indicador não definido.
4.6.1	Avaliação da migração neutrofílica através da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO).....	Erro! Indicador não definido.

4.6.2 Quantificação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e quimiocina (KC) no modelo de hipernocicepção induzida por carragenina após o tratamento com EPI.. **Erro! Indicador não definido.**

Indicador não definido.

4.7 Avaliação do envolvimento da via Óxido Nítrico – GMP cíclico - Proteína Quinase G - Canais de Potássio Sensíveis a ATP na prevenção da hipernocicepção causada por EPI **Erro! Indicador não definido.**

4.7.1 Avaliação do envolvimento do óxido nítrico **Erro! Indicador não definido.**

4.7.2 Avaliação do envolvimento da guanosina monofosfato cíclico (GMPc) **Erro! Indicador não definido.**

4.7.3 Avaliação do envolvimento da proteína quinase G (PKG) **Erro! Indicador não definido.**

4.7.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio ATP dependentes (K⁺ATP) **Erro! Indicador não definido.**

4.8 Avaliação do envolvimento de Amina Simpaticomimética **Erro! Indicador não definido.**

4.8.1 Hipernocicepção inflamatória aguda induzida por epinefrina. **Erro! Indicador não definido.**

4.9 Avaliação do efeito da EPI na hipernocicepção inflamatória persistente **Erro! Indicador não definido.**

4.9.1 Investigação do efeito da EPI no modelo de hipernocicepção persistente induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) **Erro! Indicador não definido.**

4.9.2 Efeito da EPI sobre o volume do edema de pata induzido por CFA **Erro! Indicador não definido.**

4.9.3 Efeito da EPI sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção induzida por CFA **Erro! Indicador não definido.**

4.9.4 Quantificação de citocinas no modelo de hipernocicepção induzida por CFA após tratamento com EPI **Erro! Indicador não definido.**

4.9.5 Avaliação da expressão proteica de iNOS por Western blot... **Erro! Indicador não definido.**

4.9.6 Efeito do tratamento com EPI sobre a mucosa gástrica**Erro! Indicador não definido.**

4.10 Formulação líquida oral a base de epiisopiloturina ..**Erro! Indicador não definido.**

4.10.1. Caracterização das Gotas EPI.....**Erro! Indicador não definido.**

• Ensaios físico-químicos de qualidade**Erro! Indicador não definido.**

• Análise organoléptica.....**Erro! Indicador não definido.**

• Determinação do pH.....**Erro! Indicador não definido.**

• Determinação da densidade.....**Erro! Indicador não definido.**

• Determinação do teor por CLAE-DAD**Erro! Indicador não definido.**

4.10.8 Avaliação preliminar da estabilidade**Erro! Indicador não definido.**

4.11 Avaliação do efeito antinociceptivo das Gotas EPI..**Erro! Indicador não definido.**

4.11.1 Avaliação da Hipernocicepção: Pressão crescente na pata (Von Frey eletrônico)
.....**Erro! Indicador não definido.**

4.11.2 Hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg).....**Erro!
Indicador não definido.**

4.11.3 Avaliação da migração neutrofílica através da atividade da enzima
Mieloperoxidase (MPO).....**Erro! Indicador não definido.**

4.11.4 Quantificação de citocinas (TNF- α e IL-10) no modelo de hipernocicepção
induzida por carragenina após o tratamento com Gotas de EPI.....**Erro! Indicador não
definido.**

4.10 Análise Estatística**Erro! Indicador não definido.**

5. RESULTADOS**Erro! Indicador não definido.**

5.1 Efeito da EPI na hipernocicepção induzida por carragenina – curva dose-efeito**Erro!
Indicador não definido.**

5.2 Análise histológica**Erro! Indicador não definido.**

5.3 Efeito da EPI na migração neutrofílica através da determinação da atividade da
MPO**Erro! Indicador não definido.**

5.4 Efeito da EPI sobre a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias**Erro!
Indicador não definido.**

- 5.5 Efeito da EPI sobre a via Óxido Nítrico / GMP cíclico / PKG / Canais K⁺ Sensíveis ao ATP **Erro! Indicador não definido.**
- 5.6 Efeito da EPI na hipernocicepção mecânica induzida por epinefrina **Erro! Indicador não definido.**
- 5.7 Efeito da EPI na hipernocicepção persistente induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos **Erro! Indicador não definido.**
- 5.8 Efeito da EPI sobre o edema de pata induzido por adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.9 EPI reduz migração de neutrófilos induzida por CFA na pata de camundongos **Erro! Indicador não definido.**
- 5.10 EPI reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por CFA na pata de camundongos **Erro! Indicador não definido.**
- 5.11 Efeito da EPI sobre expressão proteica de iNOS **Erro! Indicador não definido.**
- 5.12 Efeito do tratamento prolongado com EPI sobre a mucosa gástrica **Erro! Indicador não definido.**
- 5.13 Formulação líquida oral a base de epiisopiloturina .. **Erro! Indicador não definido.**
- 5.13.1 Preparo da formulação líquida oral a base de epiisopiloturina (Gotas EPI)... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.13.2 Caracterização físico-química das Gotas EPI..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.13.3 Avaliação preliminar da estabilidade das Gotas EPI..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.14 Avaliação do potencial antinociceptivo das Gotas EPI..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.14.1 Hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg)..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.15.2 Avaliação da migração neutrofílica através da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) **Erro! Indicador não definido.**
- 5.15.3 Quantificação de citocinas (TNF- α e IL-10) no modelo de hipernocicepção induzida por carragenina em camundongos pré-tratados com Gotas de EPI **Erro! Indicador não definido.**

6 DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
7 CONCLUSÕES	Erro! Indicador não definido.
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Erro! Indicador não definido.