



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

PEDRO EVERSON ALEXANDRE DE AQUINO

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DA N-METIL-
TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA ISOLADO DAS FOLHAS DE *Sideroxylon*
*obtusifolium***

FORTALEZA-CE

2016

PEDRO EVERSON ALEXANDRE DE AQUINO

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DA N-METIL-
TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA ISOLADO DAS FOLHAS DE *Sideroxylon*
*obtusifolium***

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.

FORTALEZA-CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A669a Aquino, Pedro Everson Alexandre de.
Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da n-metil- trans-4-hidroxi-l-prolina isolado das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* / Pedro Everson Alexandre de Aquino. – 2016.
95 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2016.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.
1. Anti-inflamatórios. 2. Analgésicos. 3. Sapotaceae. I. Título.

PEDRO EVERSON ALEXANDRE DE AQUINO

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DA N-METIL-
TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA ISOLADO DAS FOLHAS DE *Sideroxylon*
*obtusifolium***

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana(Orientadora)

**Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina, Estácio-FMJ**

Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista

Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

Universidade Federal do Ceará

Dedico este trabalho a Deus, por todas as graças alcançadas e a minha família que me apoiou e incentivou a realiza-lo.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado diversas coisas maravilhosas. Aos meus pais, Wilson e Lúcia, e meus irmãos, Eveline e Everton pelo imenso apoio, amor e carinho;

A minha orientadora Dra. Glauce, pela inestimável oportunidade de trabalharmos juntos, pela paciência e por todos os ensinamentos que tenho recebido durante esse tempo e quem sem dúvida está me fazendo amadurecer profissionalmente e pessoalmente. Muito obrigado por ser este espelho de pessoa e pesquisadora que nasceu para o ensino e a pesquisa;

Quero agradecer também aos professores do Programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, um programa reconhecido por sua excelência. Tal mérito é devido ao empenho de todos vocês.

Às professoras Cléa, Danielle, Silvânia, Kalyne e todos os quem compõem o laboratório de Neurofarmacologia. Obrigado pela parceria!

A técnica Vilanir (Vila), por toda ajuda nos experimentos e por ter se tornado uma grande amiga-mãe que vou levar para toda a vida. Quero agradecer também a técnica Lena por todo apoio e amizade e as técnicas da FMJ, Janice, Aury e Viviane, pela ajuda e parceria. Como também a Talita Magalhães e Lucas Nicolau pela amizade e imensa ajuda nos experimentos;

Aos meus amigos Amanda Aragão, Priscila Caracas, Lucas Carvalho, Ítalo, Ronaldo, Gabriel, Ana Flávia, Delvane, Michelly, Júnior, Alejandra, Ludmila, Roberta, Dayana e todos os outros pela acolhida em Fortaleza. Sou muito grato a Deus por ter me mostrado pessoas tão maravilhosas como vocês;

Aos meus professores da graduação e em especial a Ana Luiza, Ana Ruth, Irwin Alencar, Monalisa Ribeiro, Edinaldo Fagner, Elaine Lucetti e Henrique Douglas, pelos incentivos aos estudos e a pesquisa;

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro;

E por fim a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de maneira significativa para a concretização deste trabalho. O meu eterno agradecimento.

“Não temas, eu venci o mundo”

Jesus Cristo

RESUMO

Sideroxylum obtusifolium (Humb. ex. Roem. &Schult) T.B. Penn (Sapotaceae) de ocorrência comum na América do Sul, é conhecida no Nordeste do Brasil como “quixabeira”. Os decoctos da casca do caule e das folhas são utilizados na medicina popular como anti-inflamatório. O presente estudo avaliou *in vitro* e *in vivo* as propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas do composto N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina (NMP) isolado das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. Camundongos *Swiss* machos (25-30g; n=8-10) foram utilizados nos testes da formalina, contorções abdominais induzidas por ácido acético, capsaicina e Von-Frey. Os efeitos anti-inflamatórios foram investigados através dos testes do edema de pata e de peritonite, ambos induzidos por carragenina. Foram investigados possíveis mecanismos de ação da NMP através de bloqueio farmacológico por naloxona, ioimbina e glibenclamida. As patas inflamadas pela carragenina foram coletadas e em seguida encaminhadas para o estudo histológico e ensaio imunohistoquímico para TNF- α , iNOS, COX-2 e NF-kB. Foi verificada a participação de neutrófilos através da dosagem de mieloperoxidase (MPO) e a atividade antioxidante foi testada pelo método de DPPH. Os resultados mostraram redução de 35, 42 e 52% na 1^o fase (neurogênica) e de 30, 61 e 78% na 2^o fase (inflamatória) do teste de formalina, e em 34, 53 e 72% nas contorções abdominais/20 min, induzidas por ácido acético, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente ($P < 0,05$). A NMP (100 mg/kg) diminuiu a hipernocicepção no teste da capsaicina e de Von-Frey ($P < 0,05$). Houve redução do edema após os tratamentos com a NMP em todos os períodos ($P < 0,05$). A NMP diminuiu de forma significativa o número de leucócitos do infiltrado da cavidade peritoneal induzida pela carragenina no teste de peritonite. Os resultados dos testes *in vitro*, mostraram redução da atividade da MPO ($P < 0,05$), mas não houve efeito antioxidante no teste de DPPH. Observou-se uma redução significativas do número de células imunomarcadas para TNF- α , iNOS, COX-2 e NF-kB nos grupos tratados com NMP ($P < 0,05$). A investigação dos possíveis mecanismos da ação anti-inflamatória e antinociceptiva da NMP sugerem o envolvimento de receptores vanilóides do tipo TRPV1 e a participação de canais de K⁺, dependentes de ATP, descartam a participação de receptores opióides e α_2 -adrenérgicos. Os achados do presente estudo indicam que a NMP possui efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos relevantes que podem ser favoráveis como ferramenta fisiofarmacológica para o tratamento de patologias nas quais essas vias são evidenciadas.

Palavras-chave: Anti-inflamatório, Antinociceptivo. *Sideroxylon obtusifolium*. L-prolina.

Anti-inflammatory and Antinociceptive activity of the N-METHYL-TRANS-4-HYDROXY-L-PROLINE isolated from leaves *Sideroxylon obtusifolium*

ABSTRACT

Sideroxylum obtusifolium (Humb. Ex. Roem. & Schult) T. B. Penn (Sapotaceae) of common occurrence in South America, is known in the Northeast of Brazil as "Quixabeira". The decoctions from the stem bark and leaves are used in folk medicine as anti-inflammatory. The present study evaluated by in vitro and in vivo models the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the compound N-methyl-trans-4-hydroxy-L-proline (NMP) isolated from the leaves of *Sideroxylum obtusifolium*. Male Swiss mice (25-30 g; n = 8-10) were used in the tests of formalin, abdominal contractions induced by acetic acid, capsaicin and von-Frey. Anti-inflammatory effects were investigated using the tests of paw edema and peritonitis, both induced by carrageenan. We investigated possible mechanisms of action of NMP through the pharmacological blockade by naloxone, yohimbine and glibenclamide. Furthermore, the inflamed legs by carrageenan were collected and then sent for histological and immunohistochemical assay for TNF- α , iNOS, COX-2 and NF-kB. The participation of neutrophils was verified by myeloperoxidase dosage (MPO) and the antioxidant activity was tested by the DPPH method. The results showed reductions of 35, 42 and 52% in the 1st phase (neurogenic) and of 30, 61 and 78% in the 2nd phase (inflammatory) of the formalin test, and of 34, 53 and 72% in the writhings /20 min induced by acetic acid at the doses of 25, 50 and 100 mg / kg, respectively (P <0.05). NMP (100 mg / kg) reduced the hyperalgesia in the capsaicin and Von-Frey tests (P <0.05). There was a reduction of edema after treatment with NMP at all periods (P <0.05). NMP decreased significantly the number of leukocytes infiltrate of the peritoneal cavity induced by carrageenan. The results of the in vitro tests showed reduced MPO activity (P <0.05) but there was no antioxidant effect in DPPH test. There were significant reductions in the number of immunostained cells to TNF- α , iNOS, COX-2 and NF-kB in the groups treated with NMP (P <0.05). The investigation of possible mechanisms of anti-inflammatory action and antinociceptive of NMP suggest the involvement of the vanilloid receptor TRPV1 and the participation of K⁺ channels, ATP-dependent and discard the participation of opioids and α 2-adrenergic receptors. The findings of this study indicate that NMP has significant anti-inflammatory and antinociceptive effects that can be favorable as pharmacological tool for the treatment of conditions in which these pathways are highlighted.

Keywords: Anti-inflammatory. Antinociceptive. *Sideroxylum obtusifolium*. L-proline.

FIGURAS

1	Caracterização do processo inflamatório.....	18
2	Representação do comportamento de leucócitos frente a um estímulo inflamatório.....	21
3	Cascata inflamatória desencadeada pela clivagem do ácido araquidônico.....	25
4	Produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio	30
5	Cascata da produção de cininas.....	32
6	Vias de ativação do NF-kB.....	34
7	Nociceptor	37
8	Tipos de fibras nociceptivas.....	38
9	Esquema ilustrativo do corpo dorsal e ventral da medula espinhal.....	40
10	Principais vias neuronais da dor.....	41
11	<i>Sideroxylon obtusifolium</i> (árvore, folhas, flores e frutos).....	43
12	Estrutura química da N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina.....	49
13	Efeito da FLP sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT.....	58
14	Efeito antiedematogênico da NMP no modelo de edema de pata induzido por carragenina.....	59
15	Fotomicrografias de tecido conjuntivo de patas e contagem de polimorfonucleares em 10 campos (400x).....	61
16	Fotomicrografias (400x) de imunohistoquímica para TNF- α	62
17	Fotomicrografias (400x) de imunohistoquímica para iNOS.....	63

18	Fotomicrografias (400x) de imunohistoquímica para COX- 2.....	63
19	Fotomicrografias (400x) de imunohistoquímica para NF-kB.....	64
20	Efeito da administração da NMP 100 mg/kg sobre a migração de leucócitos induzida por carragenina medida pela contagem de leucócitos totais no fluido peritoneal.....	65
21	Efeito da administração de NMP 100mg/kg sobre a migração de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina medida pela contagem diferencial de neutrófilos no fluido peritoneal.....	65
22	Efeito da NMP na degranulação de neutrófilos humanos estimulados pelo PMA, determinados pela atividade da mieloperoxidase (MPO).....	66
23	Efeito da NMP 25,50 e 100 mg/kg sobre o tempo de labedura da pata traseira direita na primeira e segunda fase do teste de formalina.....	67
24	Efeito da NMP 25,50 e 100mg/kg sobre o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	68
25	Envolvimento da NMP no modelo de lambadura da pata induzida por capsaicina	69
26	Efeito da NMP 100mg/kg sobre a hipernocicepção mecânica plantar induzida por carragenina 1% em camundongos.	70
27	Estudo do envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da NMP no modelo de nocicepção induzido pela formalina.....	71
28	Estudo do envolvimento dos receptores α_2 adrenérgicos no efeito antinociceptivo da NMP no modelo de nocicepção induzido pela formalina.....	72
29	Envolvimento de canais K(ATP) dependentes no efeito antinociceptivo da NMP	73
30	Capacidade antioxidante da NMP pelo teste de DPPH.....	74
31	Figura esquemática dos possíveis mecanismos de ação da NMP.....	81

LISTA DE TABELAS

1	Efeito da NMP no edema de pata ocasionado pela carragenina.....	59
---	---	----

LISTA DE QUADROS

1	Substâncias e reagentes utilizados.....	47
---	---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Considerações sobre o processo inflamatório.....	19
1.2 Alterações nos vasos e células ocasionados pela inflamação	20
1.3 Mediadores inflamatórios	22
1.3.1 Histamina	23
1.3.2 Serotonina.....	23
1.3.3 Metabólitos do ácido araquidônico	24
1.3.4 Fator de ativação plaquetária.....	26
1.3.6 Interleucina 1 (IL-1)	27
1.3.7 Interleucina 6 (IL-6)	28
1.3.8 Interleucina 12 (IL-12)	28
1.3.9 Interferon gama (INF- γ).....	28
1.3.10 Quimiocinas	29
1.3.11 Estresse oxidativo	30
1.3.12 Óxido Nítrico	32
1.3.13 Sistema complemento e das Cininas.....	32
1.3.14 Fator Nuclear Kappa B (NF-kB)	34
1.4 Nocicepção e Dor.....	36
1.4.1 Fisiopatologia da dor	36
1.4.2 Nociceptores	37
1.4.3 Transmissão da Informação Nociceptiva.....	39
1.5 <i>Sideroxylon obtusifolium</i>	42
1.6 Aplicações da <i>Sideroxylon obtusifolium</i> na Medicina Popular.....	44
1.7 Atividades biológicas da L-prolina e derivados.....	45
2. JUSTIFICATIVA	46
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos específicos	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1 Substâncias e reagentes	48
4.2 Material Botânico	49

4.3 Estrutura e determinação da N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina.....	49
4.4 Animais	50
4.5 Viabilidade celular através da atividade metabólica da célula (teste do MTT).....	51
4.6 Atividade Anti-inflamatória.....	52
4.6.2 Peritonite	52
4.6.3 Imunohistoquímica para TNF- α , iNOS, COX-2 e NF-kB	53
4.6.4 Avaliação Histopatológica	53
4.6.5 Determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO) liberado a partir de neutrófilos humanos	54
4.7 Avaliação da Atividade Antinociceptiva	54
4.7.1 Teste da formalina.....	54
4.7.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	55
4.7.3 Teste da capsaicina.....	55
4.7.4 Teste de hipernocicepção mecânica plantar	56
4.8 Mecanismos de ação para nocicepção	56
4.8.1 Sistema opióide	56
4.8.2 Sistema adrenérgico	57
4.8.3 Canais de potássio dependentes de ATP.....	57
4.9 Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil- 1-picrilhidrazila) <i>in vitro</i>	57
4. 10 Análise Estatística.....	58
5 RESULTADOS	58
5.1 Efeito da NMP na viabilidade celular de neutrófilos através da atividade metabólica da célula.....	58
5.2 Atividade anti-inflamatória.....	59
5.2.1 Edema de pata induzido pela carragenina	59
5.2.2 Análise histológica das patas de camundongos submetidos ao edema de pata induzido por carragenina.....	61
5.2.3 Efeito da fração da NMP na marcação imunohistoquímica para TNF- α , iNOS, COX-2 e NF-kB	63
5.2.4 Peritonite induzida por carragenina em camundongos	65
5.2.5 Efeito da NMP na degranulação de neutrófilos humanos induzida por PMA: atividades da enzima mieloperoxidase (MPO).....	67
5.3 Atividade antinociceptiva	67
5.3.1 Teste da Formalina.....	67

5.3.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	68
5.3.3 Teste da Capsaicina.....	69
5.3.4 Hipernocicepção Mecânica Plantar.....	70
5.4 Mecanismos de ação para atividade antinociceptiva.....	71
5.4.1 Investigação da participação dos receptores opióides.....	71
5.4.2 Investigação da participação de receptores α_2 adrenérgicos.....	72
5.4.3 Participação dos canais de potássio dependentes de ATP.....	73
5.5 Avaliação da atividade antioxidante da NMP através do teste de DPPH.....	74
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%- Porcentagem

µg- Micrograma

µL-Microlitro

5HT- Serotonina

AA - ácido araquidônico

AINES - antiinflamatórios não esteroidais

ANOVA – (Análise de variância)

ATP- Adenosina Trifosfato

CEUA- Comissão de Experimentação e Uso de Animais

Cg- Carragenina

CG – cromatografia gasosa

CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX- cicloxigenase

DEXA- Dexametasona

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrozila

EPM – erro padrão da média

EIM – efeito inibitório médio

GABA- ácido gama- aminobutírico

HE - Hematoxilina-Eosina

i.p. – intraperitoneal

ICAM-1e ICAM-2- (Intercellular Adhesion Molecule)

IL - interleucina

IFN- Interferon

iNOS- Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase

LOX – lipoxigenase

MPO – mieloperoxidase

n – número

NIH - *National Institute of Health* (Instituto Nacional de Saúde)

NMDA - N-metil-D-aspartato

NF- κ B - Fator de transcrição nuclear Kappa B (do inglês: Nuclear factor Kappa B)

nNOS - Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase

NOS - Óxido nítrico

p/v – peso por volume

PBS - (tampão fosfato – salino)

PGE₂ – prostaglandina E

PKC – proteína quinase C

rpm – rotações por minuto

s.c. - subcutâneo

SCP – substância cinzenta periaquedutal

TNF- fator de necrose tumoral

Tr – tempo de retenção

TBXA₂ - Tromboxano

TRPV– *transient receptor potential vanilloid* (receptor de capsaicina)

VCAM - Molécula de adesão celular

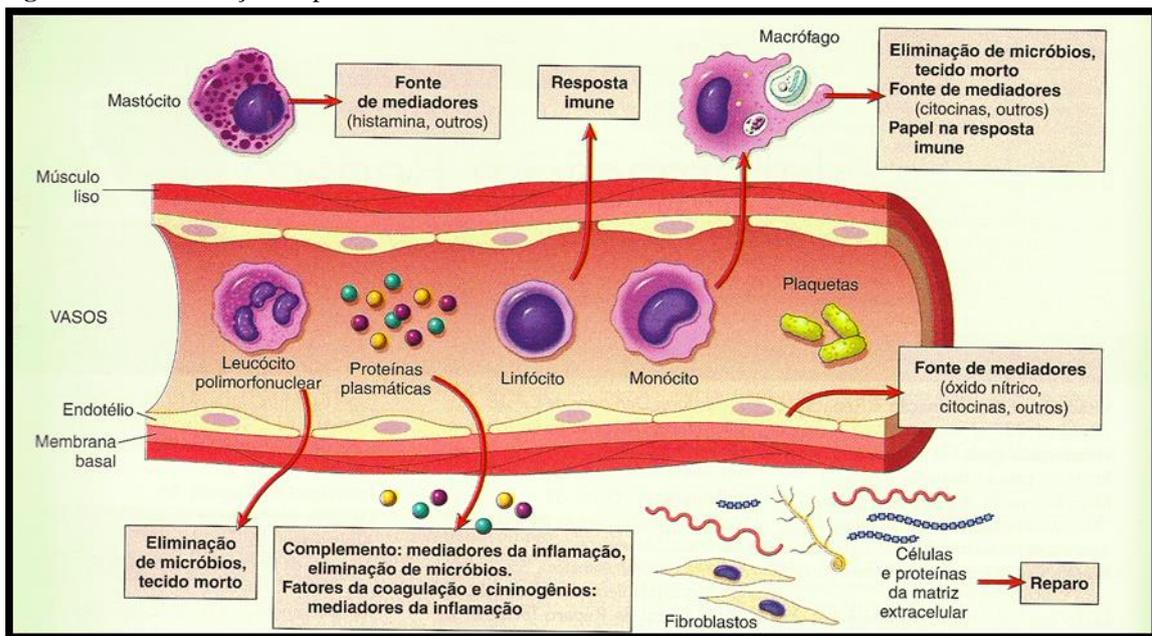
v/v – volume por volume

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre o processo inflamatório

A inflamação é uma resposta protetora que envolve células do hospedeiro, vasos sanguíneos, proteínas e outros mediadores destinados a eliminar a causa inicial da lesão celular, bem como as células e tecidos necróticos e iniciar o processo de reparo (figura 1). No entanto estes mesmos mecanismos podem causar danos irreparáveis se a reação for muito intensa, como em casos de infecções acentuadas, quando o agente causador resiste à erradicação, ou ainda inapropriada no caso das doenças autoimunes (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Figura 1: Caracterização do processo inflamatório.



Componentes das respostas inflamatórias, aguda e crônica, e suas principais funções. Os papéis dessas células e moléculas na inflamação (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Os sinais cardinais que identificam a inflamação são: o calor, rubor, tumor, dor e a perda da função. Normalmente isto é controlado e autolimitado. As células e mediadores são ativados apenas em resposta a lesão. Os tecidos inflamados podem responder a estímulos nocivos, tais como patógenos, células lesionadas e injúrias químicas, térmicas ou mecânicas (ALESSANDRI et al., 2013).

A resposta de um processo inflamatório pode ser classificada como aguda ou crônica, dependendo da persistência da lesão e sinais clínicos. Uma resposta inflamatória aguda apresenta dois componentes, uma resposta natural que corresponde a um conjunto de mecanismos de defesa imediata do próprio organismo capaz de reconhecer e destruir o agente agressor; e uma resposta imunológica adquirida ou específica, que é somente desencadeada após um patógeno ter sido reconhecido pelo sistema inato. A fase adquirida é constituída por um conjunto de respostas específicas contra o patógeno e também torna a imunidade inata mais eficiente graças ao sistema de memória (mediados por linfócitos) (HENSON, 2005).

A fase aguda caracteriza-se pelos eventos vasculares, observando-se a vasodilatação local, o aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos, particularmente neutrófilos. Na fase crônica ocorre infiltração de células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, destruição tecidual induzida pelos produtos das células inflamatórias, reparo, proliferação de novos vasos (angiogênese), fibrose e em alguns casos degeneração tecidual, geralmente causando dor através da sensibilização e ativação de nociceptores (LEES et al., 2004).

Existe um grande interesse da medicina experimental na tentativa de buscar respostas referentes à etiologia fisiopatológica e controle do processo inflamatório, devido aos danos teciduais que ocorrem em diversas doenças, graças à exacerbação da resposta inflamatória (CARVALHO; CARVALHO; RIO-SANTOS, 2004).

1.2 Alterações nos vasos e células ocasionados pela inflamação

Um papel fundamental na mudança da permeabilidade vascular é facilitar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas, ao sítio de lesão tecidual. A inflamação desempenha um papel importante na regulação do sistema vascular, integrando diversos tipos de respostas e liberando uma variedade de substâncias vasoativas (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os sinais da inflamação se desenvolvem rapidamente após a lesão, resultando em uma intensa vasodilatação. Ocorre um aumento do fluxo sanguíneo e ainda, um aumento da permeabilidade capilar, destinados a trazer células e proteínas para o local da injúria. Existe uma vasoconstrição rápida e em seguida a vasodilatação de arteríolas aumentando o fluxo de

sangue e abertura dos leitos vasculares, responsáveis pelo eritema e calor observados na inflamação. Os leucócitos começam a se acumular (marginação) ao longo da superfície vascular (BHANDARI et al., 2005).

Vários mecanismos podem contribuir para o aumento da permeabilidade vascular como a contração da célula endotelial, formando lacunas intercelulares nas vênulas pós-capilares, após a ligação de mediadores como a histamina, bradicinina, e leucotrienos aos receptores específicos; a lesão direta nas células endoteliais, o aumento transitórios de proteínas e o extravasamento de novos vasos sanguíneos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Na reação inflamatória uma característica marcante é o acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos. Estas células incorporam e degradam bactérias, complexos imunes e restos de células necróticas, e as suas enzimas lisossomais contribuindo com a resposta defensiva do hospedeiro. Entretanto, uma vez ativados, podem prolongar a inflamação e induzir dano tecidual pela liberação de enzimas, mediadores químicos e radicais livres, que são tóxicos para os tecidos (LORENZI, 2006).

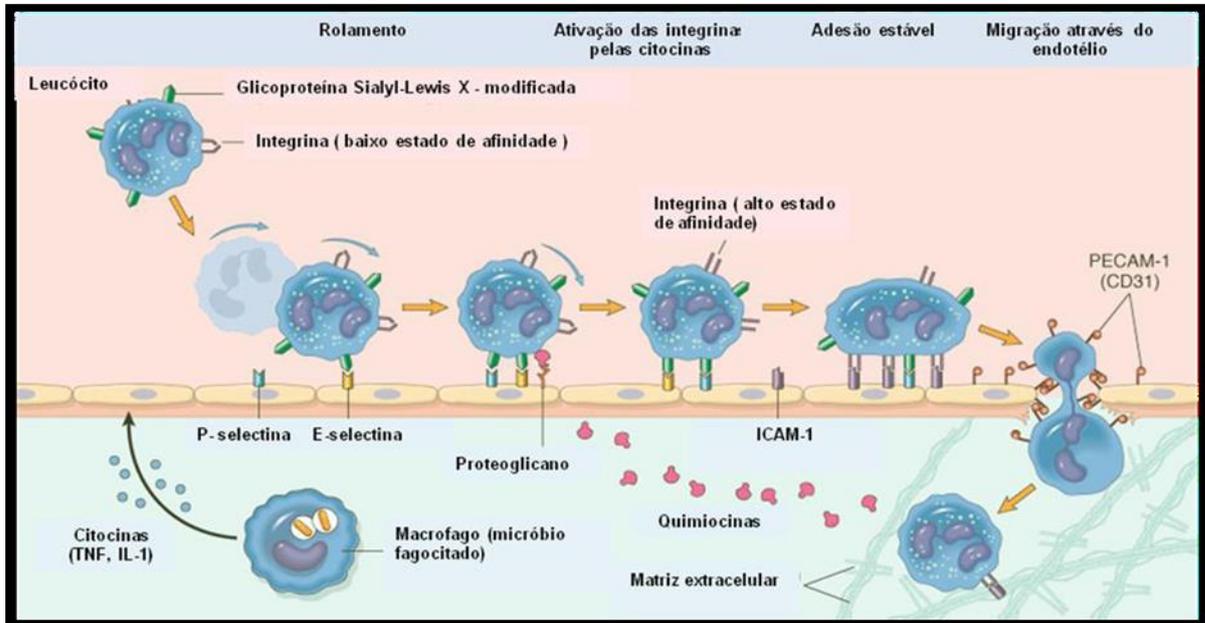
Os neutrófilos predominam na inflamação aguda e são substituídos posteriormente pelos macrófagos. A sequência de eventos neste processo envolve marginação e rolamento; ativação, adesão e extensão na superfície do endotélio; passagem através da barreira das células endoteliais ou diapedese; quimiotaxia, fagocitose, degradação intracelular e liberação extracelular de produtos leucocitários (figura 2) (WAGNER; ROTH, 2000).

O processo de migração se inicia quando os leucócitos ocupam a periferia do vaso, aderindo ao endotélio e deslocando-se sobre a superfície endotelial, posteriormente são ativados e aderem firmemente ao endotélio, e migram através da parede das vênulas, passando entre as células endoteliais. Se as células endoteliais são ativadas por citocinas e outros mediadores produzidos localmente, elas expressam moléculas de adesão, naturalmente expressas na membrana ou com expressão aumentada após ativação do endotélio ou leucócito. Os leucócitos rolam através das selectinas (E-selectina, P-selectina e L-selectina. As integrinas expressas na superfície celular dos leucócitos são: ICAM-1 e 2, MAC-I, VCAM-1, CD31 (KUMAR; PERKINS, 2008).

Após a aderência ao endotélio os leucócitos migram pelas paredes dos vasos (diapedese), sendo as quimiocinas e a molécula de aderência plaquetária importantes neste processo (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). No local da lesão, ocorre o reconhecimento do agente agressor (ativação leucocitária), após este reconhecimento ocorre uma série de reações

a fim de conter o agente causador da inflamação tais como a fagocitose, espécies reativas de oxigênio, enzimas lisossômiais, entre outras (RODRIGUES et al., 2002).

Figura 2: Representação do comportamento de leucócitos frente a um estímulo inflamatório.



Mecanismos de migração dos leucócitos através dos vasos sanguíneos. Primeiro, os leucócitos rolam, depois se tornam ativados e aderem ao endotélio, então transmigram através do endotélio, penetrando na membrana basal e migrando em direção aos quimioatraentes liberados da fonte de lesão. Diferentes moléculas têm papéis predominantes nas diferentes etapas deste processo: selectinas no rolamento, quimiocinas na ativação dos leucócitos, em especial, neutrófilos para aumentar a avidéz das integrinas; integrinas em firme adesão; e CD31(PECAM-1) na transmigração. ICAM-1: molécula 1 de adesão intercelular; IL-1: interleucina 1; PECAM-1: molécula 1 de adesão celular endotelial à plaquetas; TNF: fator de necrose tumoral (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

1.3 Mediadores inflamatórios

Os mediadores podem ser produzidos pelas células ou circular pelo plasma, como precursores inativos que são ativados no local da inflamação. Os mediadores derivados de células são: aminas vasoativas, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária, citocinas, espécies reativas do oxigênio, óxido nítrico e neuropeptídios. E os mediadores derivados de proteínas plasmáticas são: o sistema complemento, sistema de coagulação e das cininas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

1.3.1 Histamina

A histamina é uma amina vasoativa, proveniente principalmente dos mastócitos e basófilos, sintetizada do aminoácido histidina, sob ação da L-histidina decarboxilase (HDC), a qual contém piridoxal fosfato (vitamina B6) (CRIADO, MARUTA, 2010).

A atividade biológica da histamina ocorre a partir de sua interação com quatro subtipos de receptores, acoplados à proteína G, denominados H1, H2, H3 e H4. As ações desencadeadas pela histamina, mediadas pelo receptor H1, estão relacionadas a processos inflamatórios e alérgicos, tais como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, secreção de muco e broncoconstrição (HOWARTH, 1990; HUANG et al., 2008).

A histamina também pode exercer efeitos sobre células inflamatórias e ocasionar ativação celular e liberação de mediadores pró-inflamatórios (como exemplo, leucotrienos e citocinas) (NUNES, 2006).

1.3.2 Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) tem efeitos de vasodilatação similares aos da histamina. É encontrado, sobretudo nos grânulos densos das plaquetas, e é liberado durante a agregação plaquetária, induzindo vasoconstrição no processo de coagulação. Sabe-se que a serotonina apresenta uma variedade de efeitos devido à presença de múltiplos subtipos de receptores presentes em neurônios, musculatura lisa e, possivelmente, nas células neuroendócrinas. Existem sete tipos ou famílias e múltiplos subtipos de receptores que já foram identificados, denominados como 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ (SIKANDER et al., 2009).

Verificou-se que os fármacos inibidores da recaptação da serotonina (ISRS), muito usados para o tratamento de síndromes depressivas, parecem modificar o processo inflamatório, diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias como PGE₂ e NO (BIANCHI et al., 1994, YARON et al., 1999, KUBERA et al., 2000, ROUMESTAN et al., 2007, GUEMEI et al., 2008, SACRE et al., 2010).

1.3.3 Metabólitos do ácido araquidônico

O ácido araquidônico tem mostrado influenciar uma série de eventos e mecanismos celulares durante o processo de inflamação, desde a transdução de sinal até a síntese proteica (ANDRADE; CARMO, 2006).

Os eicosanoides são produtos derivados do metabolismo de ácidos graxos essenciais. A família dos eicosanoides é composta das prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos hidroxilados. Os substratos para a formação dos eicosanoides são o ácido dihomo-gama-linolenico, o ácido araquidônico e o ácido eicosapentaenoico. Para a síntese destas substâncias, o ácido graxo precursor é clivado dos fosfolípídios de membrana pela ação da fosfolipase A₂ ou fosfolipase C dependendo do subtipo fosfatidil ao qual o ácido graxo essencial está ligado (KONIG et al, 1997).

Quando a metabolização do ácido araquidônico (figura 3) é por via das ciclooxigenases, há a formação de prostanoides como a prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX) (KONIG et al, 1997). As prostaglandinas compreendem muitos subtipos, os quais possuem diferentes funções. A prostaglandina E (PGE) tem sido amplamente investigada, em função do seu importante papel imunomodulador. Entre os tromboxanos, apenas o tromboxano A (TX_A) é ativo, sendo o tromboxano B (TX_B) inativo (ANDRADE; CARMO, 2006).

As prostaglandinas estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação ou vasoconstrição, contração ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina, hipotensão, aumento do fluxo sanguíneo renal, inibição da secreção gástrica de ácido, resposta imunológica, hiperalgesia, regulação da atividade quimiotática celular, resposta endócrina, angiogênese e inúmeras outras funções celulares que controlam mecanismos fisiológicos e patológicos no organismo (YOUUDIM; MARTIN; JOSEPH, 2000, QIU, 2003).

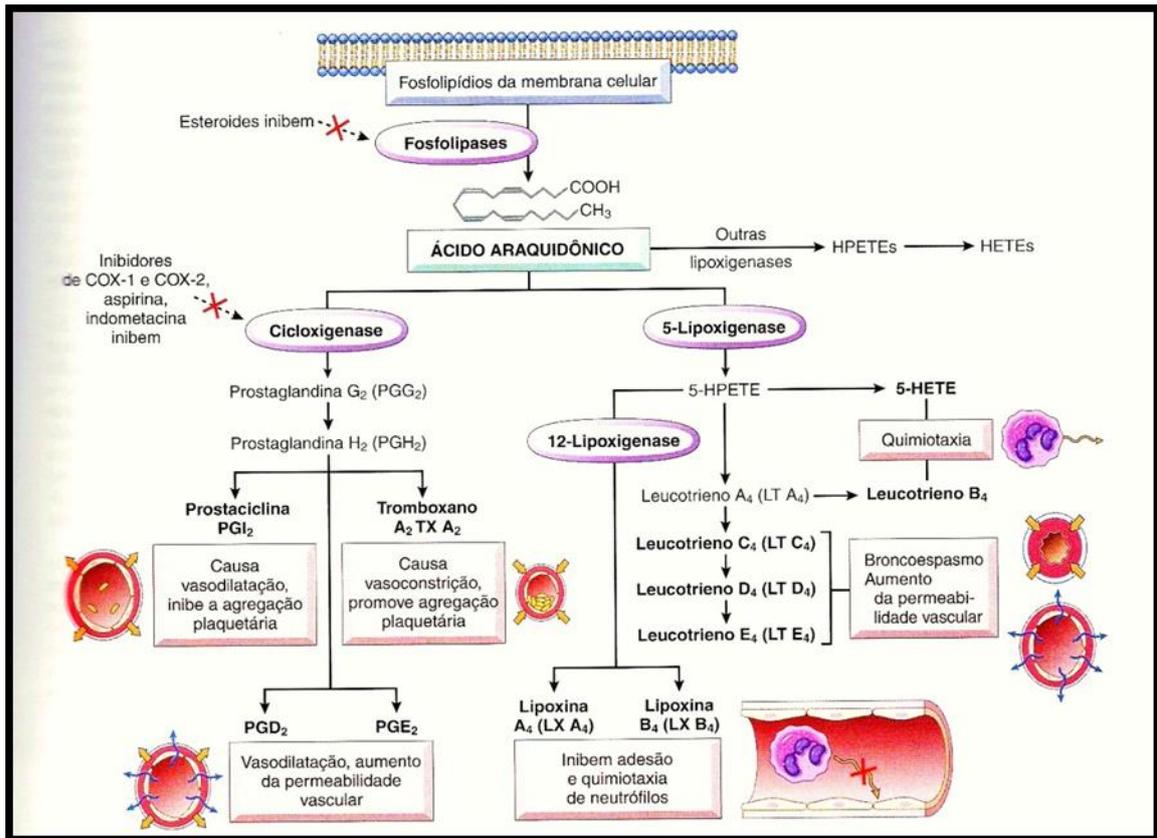
Em relação ao envolvimento de prostaglandinas na dor inflamatória, sabe-se que este processo é iniciado com a sensibilização de nociceptores, pelas PGI₂, PGE₁ e PGE₂, tornando-os mais responsivos aos agentes álgicos endógenos, como bradicinina e histamina. Nesse sentido, tem sido referido que a PGI₂ relaciona-se com a hiperalgesia imediata e de curta duração, enquanto a PGE₂ com a dor de ação prolongada, que pode persistir por um período de até seis horas. Além disso, a PGE₂ é um potente eicosanoide pró- inflamatório, estando envolvido na patogenia da febre e inflamação (HILÁRIO, TERRERI, LEN et al., 2006).

A prostaglandina D₂ é o principal metabólito da via da cicloxigenase dos mastócitos, causa intensa vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular, potencializando a formação do edema (RAIBLE et al., 1992). A prostaciclina I₂ é um vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. O tromboxano A₂ (substância que favorece a coagulação), age como potente agente agregante e vasoconstritor (BOOTHE, 2005).

Uma outra via de formação de eicosanoides é a via da lipooxigenase, produzidos pela ação da 5-lipoxigenase, dando origem aos leucotrienos, que são potentes agentes quimiotáticos, causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular. Nesta via, há a formação do ácido hidroperoxieicosanoico e dos leucotrieno A, os quais sucedem a formação dos demais membros ativos da família dos leucotrienos: LTB, LTC, LTD e LTE. Os leucotrienos derivados do ácido araquidônico: hidroperoxieicostetraenoico (HEPETE) recebem um sufixo “4” e aqueles oriundos do ácido hidroieicosapentanoico (HETE) recebem o sufixo “5”. Os leucotrienos derivados do ácido dihomo-gama-linolenico recebem o sufixo “3” (ANDRADE; CARMO, 2006).

As lipoxinas (LX) também são derivadas do ácido araquidônico e foram os primeiros mediadores eicosanoides reconhecidos com atividade anti-inflamatória. São caracterizados como ácido 5,6,15-L-trihidroxi-7,9,11,13- eicosatetraenoico (lipoxina A₄, LXA₄) e ácido 5D,14,15-L-trihidroxi-6,8,10,12- eicosatetraenoico (lipoxina B₄, LXB₄), as quais inibem a quimiotaxia e a aderência dos neutrófilos ao endotélio, funcionando como antagonistas dos leucotrienos (SERHAN, 2005).

Figura 3: Cascata inflamatória desencadeada pela clivagem do ácido araquidônico



Geração de metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação. Notar as atividades enzimáticas cuja inibição por intervenção farmacológica bloqueia as principais vias. COX-1 e COX-2: cicloxigenases 1 e 2; HETE: ácido hidroxi-eicosatetraenoico; HPETE: ácido hidroperoxi-eicosatetraenoico (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

1.3.4 Fator de ativação plaquetária

O fator de agregação plaquetária (PAF) tem a capacidade de agregar plaquetas e causar degranulação das mesmas. É um mediador derivado dos fosfolípidos de leucócitos e células endoteliais. O PAF causa vasoconstrição, broncoconstrição, estimula a síntese de prostaglandinas, leucotrienos, produção de colagenases e outras proteinases que degradam a matriz extracelular. É um potente agente quimiotático e aumenta a aderência dos leucócitos. Quando injetado na pele causa rubor e infiltração leucocitária (FLAUMENHAFT, 2003).

1.3.5 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T. Também está presente nos neurônios e células da glia, desempenhando funções importantes tanto na hiperalgesia inflamatória e neuropática (ZHANG; AN,2007).

O TNF- α é um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória. Pode regular respostas imunes por causa da sua influência na produção de pró-timócitos, timócitos e células T e ativação de citotoxicidade de macrófagos e células NK (natural killer), sendo uma citocina importante no controle de infecções microbianas. É também responsável pela adesão de leucócitos estimulando e/ou aumentando a expressão de moléculas de adesão (ZIDI et al., 2010).

O TNF- α pode induzir a apoptose em várias células tumorais e em células T potencialmente auto-reativas, ativar a coagulação, estimular a expressão de PGE₂, fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e outros eicosanoides. O TNF- α também pode ser mediador na produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8(ZIDI et al., 2010, OLIVEIRA et al., 2011).

1.3.6 Interleucina 1 (Il-1)

Como o TNF- α a Il-1 é ativada durante lesão celular, infecção, inflamação e são produzidas pelos mesmos tipos de células. A IL-1 produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2, também produz substância-P e ativa a enzima óxido nítrico sintetase. A IL-1 induz secreção de quimiotáticos e aumenta a expressão de moléculas de adesão celular, facilitando o recrutamento de mononucleares e estimulando a secreção de citocinas. Outra função é a expressão de metaloproteinases, causando degradação da matriz extracelular e migração de monócitos. Em adicional, a IL-1 está associada à formação e remodelamento ósseo, regulação do apetite, secreção de insulina, indução de febre e à fisiologia do hormônio do crescimento (DINARELLO,1996; WOLF et al., 2008).

1.3.7 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é um importante marcador inflamatório com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas. Está envolvida numa série de atividades imunológicas, em especial a síntese de substâncias de fase aguda pelo fígado (OLIVEIRA et al., 2011).

A IL-6 normalmente é expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores estressantes como em inflamações; também age estimulando a secreção de anticorpos pelas células B, a produção de IL-2 pelas células T e tem atividade estimuladora de colônias das células tronco hematopoiéticas (ERSHLER; KELLER, 2000).

1.3.8 Interleucina 12 (IL-12)

A IL-12 é uma citocina heterodimérica produzida principalmente por estimulação antigênica desempenhando um importante papel na resposta imune a antígenos exógenos e endógenos. Esta citocina é um intermediário importante entre a imunidade inata e adaptativa e é secretada sob estimulação de monócitos, macrófagos e células dendríticas. Está envolvida na produção e proliferação do INF- γ , a atividade citolítica das células natural killer e linfócitos T (TRINCHIERI, 1995).

1.3.9 Interferon gama (INF- γ)

O INF- γ é uma citocina potencialmente pró-inflamatória, também contribui na resposta inflamatória aguda, mas principalmente na crônica, aumentando o número de células fagocitárias e atraindo macrófagos no local da inflamação (SILVEIRA et al., 2009). Está envolvida também no processo de auto-imunidade como na expressão de antígenos de histocompatibilidade (MHC) classe II, na produção de mediadores como o TNF- α , IL-1, IL-

12 e NO e regulação negativa da síntese de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 (EL-HASHEMITE et al., 2004).

1.3.10 Quimiocinas

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular (8-12 kDa) com, aproximadamente, 70 a 80 aminoácidos de comprimento. São classificadas em quatro subfamílias: CXC, CC, CX3C e C, onde C representa cisteína e X ou X3 representa um ou três aminoácidos (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011).

Algumas quimiocinas podem ser produzidas por diversas células em resposta ao estímulo inflamatório e recrutamento dos leucócitos para locais de inflamação (função inflamatória) outras são geradas constitutivamente em vários tecidos e recrutam leucócitos para esses tecidos na ausência de inflamação (funções, homeostásica) (ROSSI; ZLOTNIK, 2000).

Grande parte das quimiocinas apresenta um importante papel no processo inflamatório. São tipicamente induzidas nos monócitos ou macrófagos e, ainda, em células epiteliais, endoteliais ou fibroblastos por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e INF- γ e também por estímulos externos como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (ROSSI; ZLOTNIK, 2000, SALLUSTO; MACKAY; LANZA- VECCHIA, 2000).

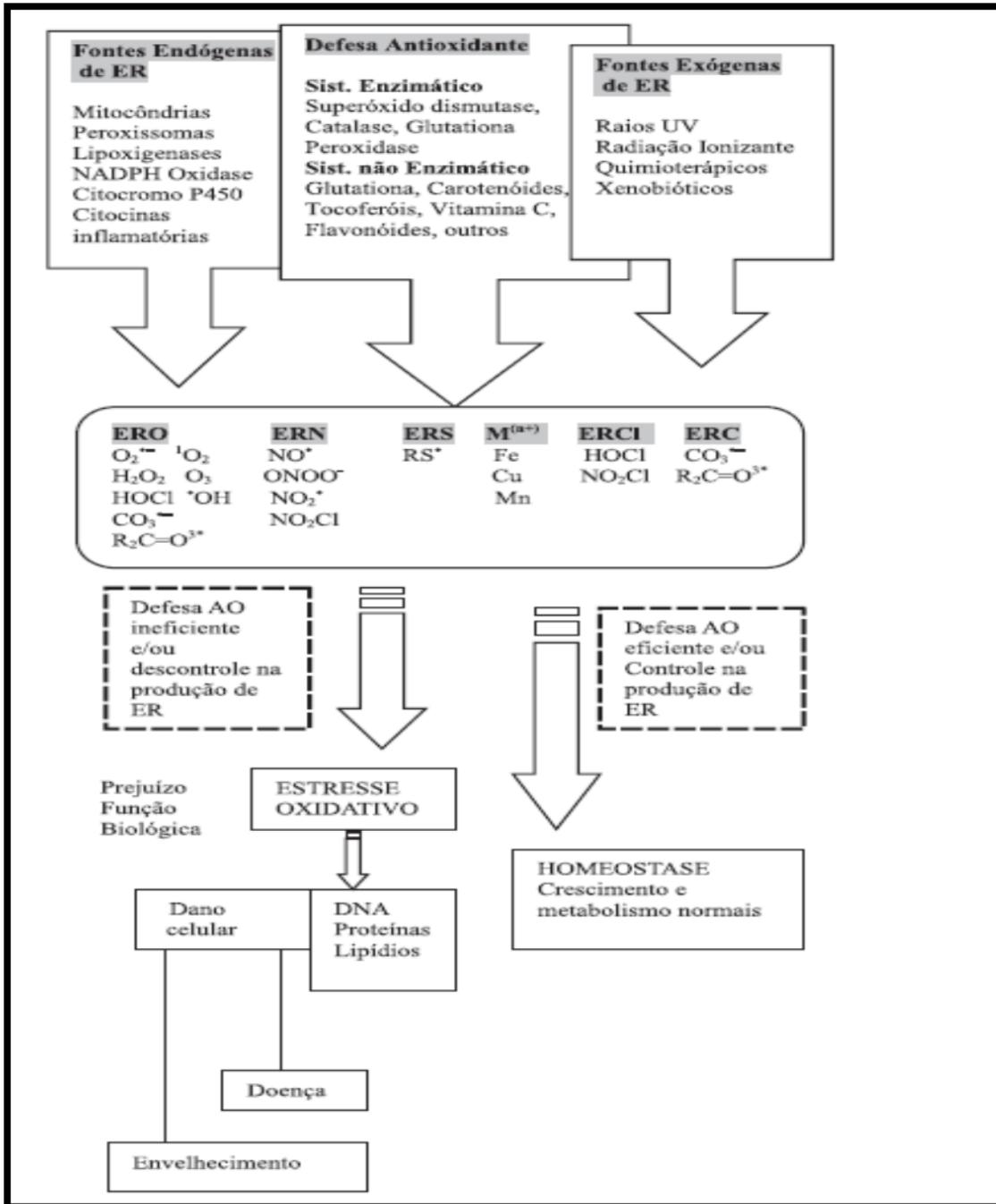
Outras quimiocinas são especificamente induzidas por citocinas envolvidas na indução de (IL-4, IL-10, IL-13), em monócitos e outras células. Esta evidência leva a crer que a produção de certas quimiocinas está associada a respostas Th1 (pró-inflamatórias) enquanto outras estarão associadas a respostas Th2 (SALLUSTO; MACKAY; LANZA-VECCHIA, 2000, SOLDEVILA; GARCÍA-ZEPEDA, 2007, GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011).

1.3.11 Estresse oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), fazem parte do metabolismo humano, têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. As ERO podem aumentar a expressão das moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, amplificando a resposta inflamatória (FINKEL, 2000).

Entretanto, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente incluindo lesão endotelial, degradação da matriz extracelular pela ativação das proteases e lesão celular (SCHAFER; BUETTNER, 2001, VASCONCELOS et al, 2007), (Figura 4).

Figura 4: produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio.



Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), de Nitrogênio (ERN), derivados de Enxofre (ERS), de Cloro (ERCl), de carbono (ERC) e metais de transição [Mⁿ⁺]. Oxidantes são gerados do metabolismo normal como na mitocôndria, em peroxissomas e em uma variedade de enzimas citosólicas. Existem diversas fontes exógenas de produção de ER. Os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, quando eficientes, mantêm a homeostase fisiológica e quando estão ineficientes, permitem a instalação do estresse oxidativo, representado pelo dano celular em macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídios, que se expressam clinicamente como envelhecimento ou doença (VASCONCELOS et al, 2007).

1.3.12 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Este radical é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintetase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS). Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

A i-NOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (MONCADA et al., 1991). A atividade da i-NOS em macrófagos é regulada e modulada por moléculas de receptoras celulares tais como receptores Toll-like e CD14, este último, tem um papel essencial nas respostas pró-inflamatórias em monócitos e macrófagos através da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) (SCHRODER et al., 2000).

A superprodução do i-NOS é importante na inflamação sendo um marcador para o tratamento de distúrbios inflamatórios, e sua prevenção é um alvo para o desenvolvimento de novas drogas que atuam sobre i-NOS (AKTAN, 2004).

1.3.13 Sistema complemento e das Cininas

O sistema complemento é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. Está constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma como expressas na membrana celular, e é ativado por duas vias, a clássica e a alternativa (figura 5). As proteínas circulantes que fazem parte dos sistemas complemento estão envolvidas em vários aspectos da reação inflamatória. Sob a ativação, as diferentes proteínas

intensidade; na presença de um ativador exógeno, esta é amplificada. Isso inicia uma cascata de eventos proteolíticos, resultando na formação de C5 convertase da via clássica e alternativa, que cliva a molécula de C5 em C5b e C5a. O C5b liga-se, por sua vez, a C6, C7 e C8 para formar o complexo C5b-8. A ligação de C9 forma o C5b-9 ou CLM. Esse complexo liga-se à membrana das células-alvo e provoca a formação de "poros", que permitem um influxo descontrolado de água e íons, com turgência e lise celular subseqüentes. Para controlar a atividade do Sistema Complemento, há inibidores endógenos regulados pela própria citólise. Essa regulação protege as células autólogas do ataque do Sistema Complemento (SHEN et al., 1997).

1.3.14 Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B)

O NF- κ B é uma proteína constituída de duas subunidades proteicas (p65 e p50) na forma de homo ou heterodímeros presente no citoplasma celular ligado à proteína I κ B, tem a função de manter o NF- κ B no citoplasma na forma inativa, impedindo a translocação desse fator de transcrição para o núcleo celular, onde exerceria seu papel de modular (induzir ou reprimir) a transcrição de inúmeros genes. O heterodímero p50-p65 é comumente utilizado como sinônimo de p50-p65 por ser o mais abundante da família do NF- κ B e em sua maioria está associado a proteína I κ B α (ROTHWARF; KARIN, 1999, MALEK et al., 2007, WONG; TERGAONKAR, 2009).

Duas vias estão relacionadas com a ativação do NF- κ B, como é visto na figura 6; a via canônica ou clássica e a via não canônica ou alternativa. A via canônica está mais associada ao processo inflamatório e a resposta inata, enquanto a via não canônica está relacionada no desenvolvimento e manutenção dos órgãos linfoides secundários (ALCAMO et al., 2002; XIAO, 2004).

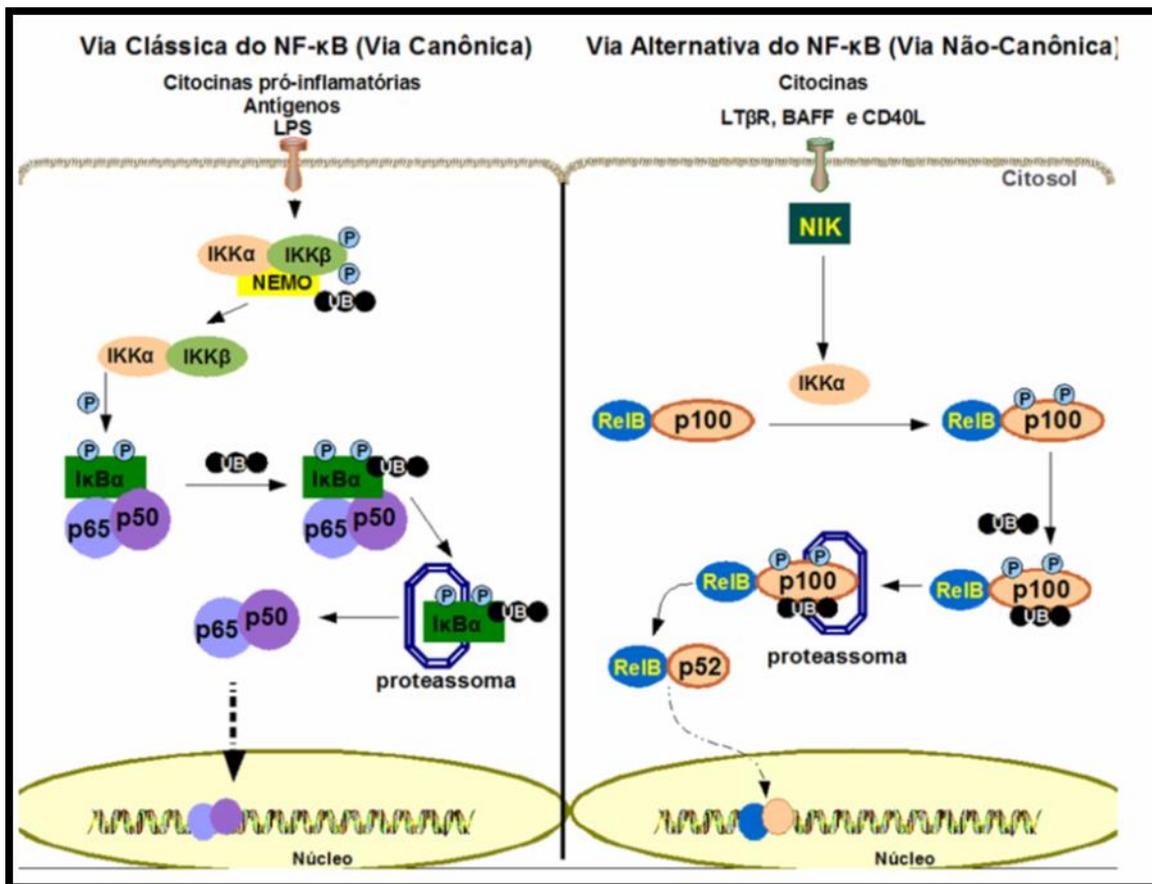
Na via clássica o I κ B é fosforilado no resíduo de serina pelo complexo de proteína quinase IKK. Essa fosforilação é o sinal para a ubiquitinação e posterior degradação do I κ B pelo proteassoma. No citoplasma um conjunto de proteínas adaptadoras e ancoradoras (TRAFs, MyD88 e TIRAP) e quinases (RIP, IRAK) formam um complexo quando há um estímulo, facilitando o recrutamento da IKK. Após a degradação do I κ B os dímeros do NF- κ B (por ex. p50-p65) são liberados e migram para o núcleo onde atuarão na regulação da transcrição de genes específicos (KALTSCHMIDT et al., 2005, FRANCO, 2010).

A expressão gênica de inúmeros genes que codificam proteínas pró-inflamatórias são aumentadas pela ativação do NF- κ B, incluindo as enzimas óxido nítrico sintetase (i-NOS), COX-2, várias citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, e outras), quimiocinas, fatores de crescimento (GM-CSF, VEGF), moléculas de adesão celular (ICAM-I, VCAM-I, E-selectinas), proteínas reguladoras da apoptose (Bcl-2, Bcl-xl, cIAPs), outros fatores de

transcrição, metaloproteínas e várias outras proteínas importantes para o desenvolvimento do processo inflamatório (HAYDEN et al., 2006, WONG; TERGAONKAR, 2009).

A via alternativa é ativada por meio da fosforilação da quinase NIK (NF- κ B), o complexo IKK torna-se ativo e promove a translocação dos dímeros do NF- κ B para o núcleo. No núcleo, o NF- κ B ativado pode induzir a expressão de mais de 200 genes, interferindo na supressão da apoptose, indução da transformação celular, proliferação, invasão, metástase, resistência a quimioterápicos e inflamação (SRIVASTAVA; RAMANA, 2009).

Figura 6: Vias de ativação do NF- κ B.



Vias de sinalização do NF- κ B. À Esquerda, via clássica (via canônica) e à direita via alternativa (não-canônica). A via clássica é dependente de NEMO, enquanto que, na via alternativa a subunidade p100 é degradada pelo proteassoma para dar origem a p52 (baseado em XIAO, 2004 e FRANCO, 2010).

1.4 Nociceção e Dor

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (1986), a dor foi conceituada como uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais e envolve as mais diferentes sensações dolorosas, e estas vão se diferenciar quanto à intensidade, à duração e à sua distribuição espacial. Já o termo nociceção está relacionado com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que formulam informações relacionadas à lesão.

Tendo como base estes conceitos, o termo dor seria melhor aplicado a seres humanos do que aos animais, pelo fato deste termo envolver um componente emocional. A dor pode ser considerada como sendo o quinto sinal vital, juntamente com a função cardiorespiratória e a térmica (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

A dor pode ser classificada em dor aguda, transitória (ativação de nociceptores tanto da pele, quanto de outros tecidos, ocorrendo na ausência de dano tecidual; provável função de proteção ao indivíduo contra esses danos; e dor crônica (dor que ultrapassa em duração a lesão tecidual precipitante). A dor aguda é desencadeada após uma lesão substancial de algum tecido, com ativação dos nociceptores mesmo após a retirada do estímulo nocivo original. Na dor aguda, os nociceptores são facilmente estimulados devido a uma alteração no padrão de resposta desses receptores; geralmente esse tipo de dor é de curta duração (CARR; GOUDAS, 1999, LOESER; MELZACK, 1999).

Quando a dor persiste mesmo após a recuperação dos tecidos, passa a ser considerada como crônica e ocorre devido a uma lesão ou patologia podendo ser perpetuada por outros fatores daqueles que originaram a dor propriamente dita, podendo permanecer por meses ou até anos (LOESER; MELZACK, 1999). A dor crônica difere substancialmente da dor aguda em relação a sua persistência, alterações adaptativas e dificuldade de tratamento (IADAROLA; CAUDLE, 1997, BESSON, 1999).

1.4.1 Fisiopatologia da dor

Exposições na pele ou qualquer outro órgão a estímulos com potencial nocivo induz à sensação desagradável, informando o indivíduo sobre o perigo real ou potencial para sua integridade física. Portanto, a informação processada pode ser diferenciada como dor

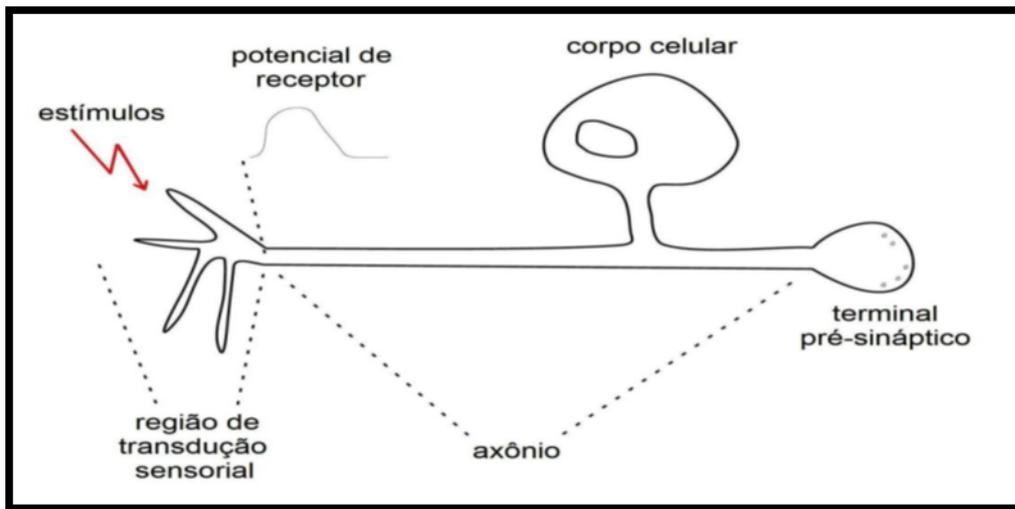
fisiológica (respostas protetoras, como o reflexo de retirada) ou dor patológica (resposta exagerada, muito além de sua utilidade protetora) (ALMEIDA et al., 2006).

A dor persistente pode ser subdividida segundo sua origem em nociceptiva e neuropática. A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação. A dor neuropática ou neurogênica origina-se devido a lesões ou disfunção de nervos periféricos ou do sistema nervoso central (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

1.4.2 Nociceptores

Os receptores nociceptivos (figura 7) são representados pelas terminações nervosas livres presentes nas fibras nervosas A δ e C e, quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação. De acordo com os estímulos que os acionam, são classificados como termomecânicos, químicos e polimodais inespecíficos (TEIXEIRA, 1990). As fibras A δ são mielinizadas e as fibras C não são mielinizadas e possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades. As fibras A δ , em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida, enquanto as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor (LEVINE; TAIWO, 1994, JULIUS; BASBAUM, 2001).

Figura 7: Nociceptor

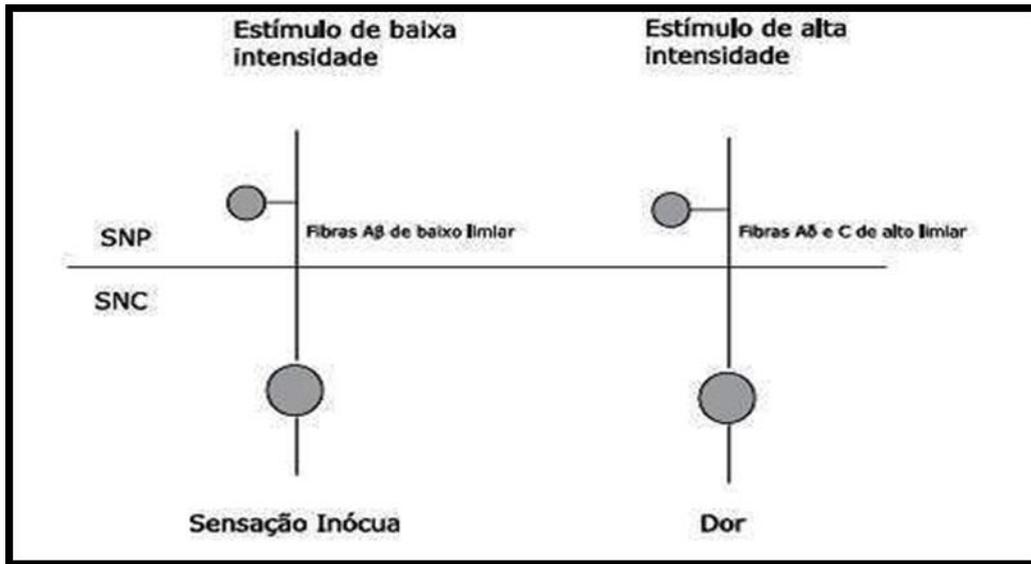


O desenho mostra as quatro regiões da célula mais significativas de um nociceptor idealizado: a região de transdução sensorial, o axônio, o corpo celular neuronal e o terminal sináptico (FEIN, 2011).

As terminações nervosas das fibras nociceptivas $A\delta$ e C são capazes de traduzir um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor (ROCHA et al, 2007).

Existem ainda as Fibras $A\beta$ que são fibras de diâmetro grande, mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas. Na ausência de dano tecidual ou nervoso as fibras $A\beta$ somente transmitem informação referente a estímulos inócuos, como tato, vibração e pressão (figura 8) (PISERA, 2005).

Figura 8: Tipos de fibras nociceptivas



Fibras aferentes responsáveis pelas informações nociceptivas (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

1.4.3 Transmissão da Informação Nociceptiva

Os corpos celulares das fibras aferentes nociceptivas situam-se nos gânglios da raiz dorsal da medula. As fibras entram na medula espinal através das raízes dorsais, terminando na substância cinzenta do corno posterior. A maioria das fibras aferentes nociceptivas terminam na região superficial do corno posterior, com as fibras C e algumas fibras A δ inervando os corpos celulares nas lâminas I e II, enquanto outras fibras A penetram mais profundamente no corno posterior (lâmina V). As células nas lâminas I e V dão origem as principais vias de projeção do corno posterior ao tálamo (figura 9) (RANG; DALE, 2012).

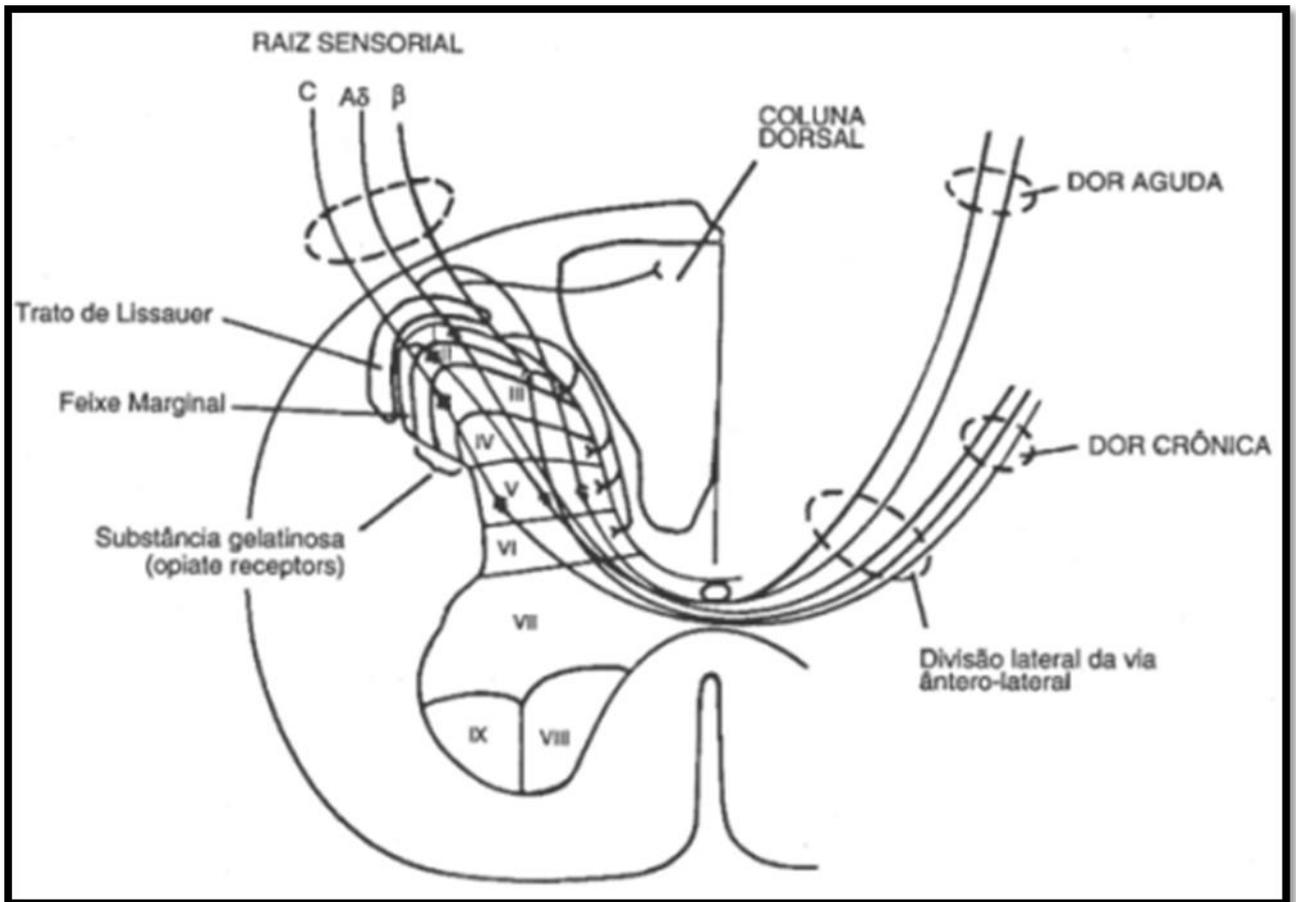
Muitos dos neurônios da lâmina I respondem exclusivamente a estímulos nociceptivos e projetam-se para centros superiores. Alguns neurônios dessa lâmina, denominados neurônios de faixa dinâmica ampla (WDR), respondem de maneira gradativa a estimulação mecânica nociva e inócua. A substância gelatinosa (lâmina II) é formada quase que exclusivamente por interneurônios, tanto inibitórios quanto excitatórios (PISERA, 2005, KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Os neurônios de primeira ordem fazem uma sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, estes cruzam a medula espinhal para ascender o trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais principalmente ao tálamo (figura 10). No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor. O tálamo desempenha um papel fundamental na integração do impulso doloroso (RUSSO; BROSE, 1998, VITOR et al, 2008, BASBAUM et al, 2009), e a substância cinzenta periaquedutal, faz parte de um circuito central que controla a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal (FIELDS; BASBAUM, 1999).

Já as vias descendentes, que partem do mesencéfalo pelo bulbo ventromedial rostral e chegam ao corno dorsal da medula espinhal, dirigem-se em sentido oposto ao da via sensitiva ascendente, exercendo um efeito inibitório e modulador sobre estruturas particularmente sobre o cordão posterior da medula, onde o balanço entre aferências nociceptivas e não-nociceptivas pode controlar a transmissão de informação dolorosa para centros superiores (GUTSTEIN et al., 1998).

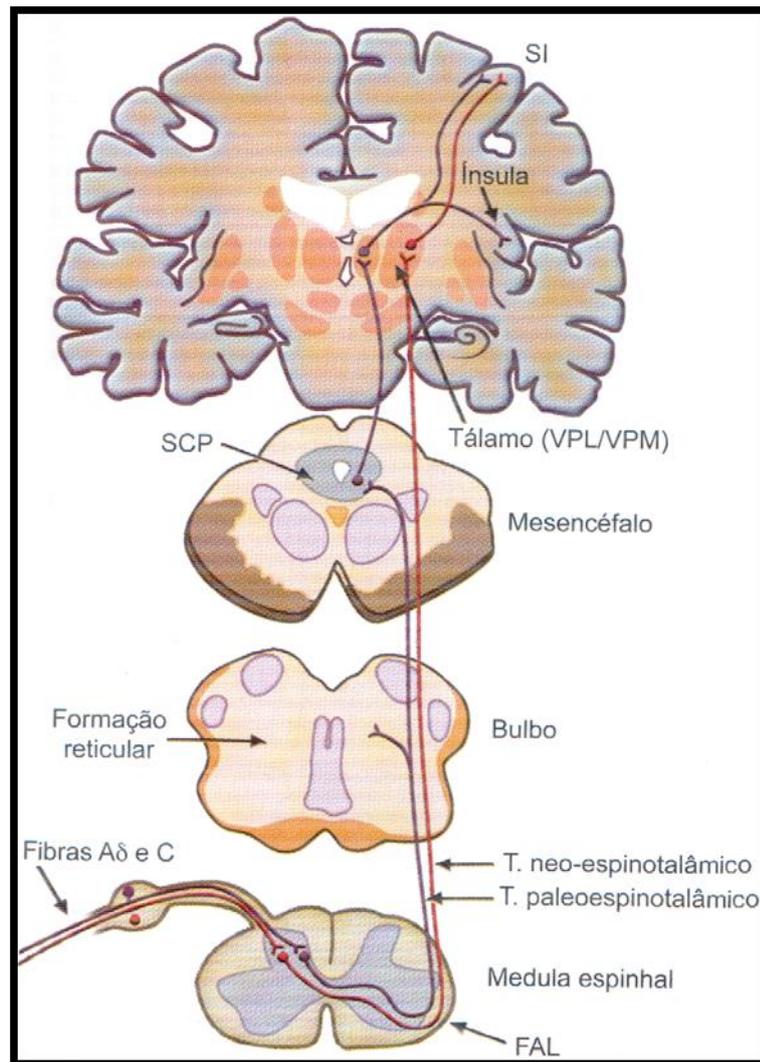
As vias descendentes controlam a transmissão de impulsos no corno dorsal que se origina na Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP), área do tronco encefálico. A SCP recebe informações de várias áreas do encéfalo relacionadas com o estado emocional, enviando-as, por projeções descendentes, para a ponta dorsal da medula espinhal, onde ocorrerá a depressão dos neurônios nociceptivos. Nesta via, foi evidenciada a endorfina, um tipo de neurotransmissor fabricado por células na SCP, sendo liberada na ponta dorsal para interagir com receptores inibitórios nos neurônios nociceptivos (JOHNSON, 2000, RANG et al., 2012). A via inibitória descendente constitui um importante alvo para ação dos analgésicos opióides.

Figura 9: Esquema ilustrativo da Lâmina dos cornos dorsal e ventral da medula espinhal.



As sinapses das fibras A-d e C na substância gelatinosa. As fibras mielinizadas b aferentes conectam com a coluna dorsal e a lâmina da substância cinzenta. (Fonte original: Guyton AC: Somatic sensations. I and II sensations. In Textbook of Medical Physiology. 7ª Ed. Philadelphia, WB Saunders, 1986.) Acesso em 28 de abril, 2016: <https://www.bibliomed.com.br/bibliomed/bmbooks/anestesiologia/livro3/cap/fig06-01.htm>

Figura 10: Principais vias neuronais da dor



Principais vias ascendentes antero-laterais de transmissão da dor. Funículo antero-lateral (FAL); Substância cinzenta periaquedutal (SCP); Complexo ventral posterior do tálamo (VPL/VPM); Córtex somatossensorial primário (SI) (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008).

1.5 *Sideroxylon obtusifolium*

A família Sapotaceae envolve 11 gêneros e cerca de 450 espécies neotropicais com representantes que vão desde a região sul dos Estados Unidos até Paraguai, Uruguai e Chile.

Estão presentes em florestas úmidas, mas podem existir em savanas e em zonas semiáridas. No bioma cerrado, ocorrem pelo menos sete gêneros e cerca de 20 espécies, sendo sete do gênero *Pouteria*. Na família, ocorrem tanto espécies hermafroditas e unissexuais como *Manilkara*, *Pradosia* e a maioria das espécies de *Sideroxylon* (GAMA; BARBOSA; OLIVEIRA, 2011).

A família Sapotaceae é uma das angiospermas mais ameaçadas pelo avanço dos desmatamentos (IUCN, 2008). Os representantes da família são árvores ou arbustos, monóicos ou dióicos, produtoras de látex. Suas folhas são alterno-dísticas ou espiraladas e simples. As flores podem ser reunidas em fascículos axilares, caulifloros ou ramifloros. Quanto ao sexo são bissexuadas ou unissexuadas, com simetria radial e pétalas do tipo gamopétalas. Os estames são adnatos e opostos aos lobos da corola e o gineceu é sincárpico, com ovário súpero (ALVES-ARAÚJO; ALVES, 2010).

A maioria dos representantes da família Sapotaceae, possui grande importância econômica, tais como os fornecedores de frutos, madeira, látex, utilizados na medicina popular e ornamentais (MONTEIRO et al., 2007, FELIPPI et al., 2008, PALAZZO et al., 2010).

Sideroxylon obtusifolium (Roem & Schult) conhecida como quixabeira, é uma árvore com até 12 m de altura. Geralmente a casca do caule é lisa, mais podem ser sulcada, desprendendo-se em placas escamiformes e côncavas, de cor marrom-acinzentada. Seus ramos possuem espinhos, de 1,5 a 4 cm de comprimento. A casca amarelada e folhas simples, opostas, com 2 a 5 cm de comprimento. Flores pequenas, amarela-claras. O fruto possui, de 1 a 1,5 cm de comprimento, forma ovóide, liso e brilhante, de cor roxo escuro, chegando a preto, quando maduro. A polpa tem sabor doce e látex viscoso. Floresce a partir de janeiro. A maturação dos frutos se dá até março, início do período chuvoso, quando a folhagem começa a se formar novamente (figura 11) (MARQUES, 2008).

A espécie *S. obtusifolium* possui diversos nomes populares como quixaba, quixabeira, rompe-gibão, coronilha, coca, maçaranduba da praia, miri, sacutiaba, guaraniná, ibirá-niná. A *S. obtusifolium* tem alguns sinônimos científicos como *Bumelia sartorum*, *Bumelia obtusifolia*, *Bumelia excelsa*, *Bumelia buxifolia*, *Bumelia dunantii*, *Bumelia cruegerii*, *Bumelia nicaraguensis* e *Lyciodes buxifolia* (DELFINO et al., 2005, LORENZI; MATOS, 2008).

Na análise química através de cromatografia em camada delgada foram identificados compostos em *S. obtusifolium*, como flavonóides, mono e sesquiterpenos, proantocianidinas

condensadas e leucoantocianidinas, triterpenos, esteróides e açúcares. As partes analisadas apresentaram-se semelhantes quanto à presença desses metabólitos, porém, o caule das plantas adultas apresentou uma variedade maior de proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas e açúcares (SILVA, 2008). Na nossa análise química foi evidenciado um derivado do aminoácido L-prolina a N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina, presente em quantidades elevadas nas folhas desta espécie.

Figura 11: *Sideroxylon obtusifolium* (Árvore, Folhas, Flores e Frutos).



Fonte: acervo do Professor Dr. Edilberto Rocha Silveira- Universidade Federal do Ceará

1.6 Aplicações da *Sideroxylon obtusifolium* na Medicina Popular

Sideroxylon obtusifolium é muito usada na terapia tradicional. Casca e folhas são usadas para diversas enfermidades como: dores em geral, úlcera duodenal, gastrite, azia,

inflamação, lesão genital, cólicas, problemas renais, problemas cardíacos, diabetes, e como expectorante (BELTRÃO et al., 2008, ARAÚJO-NETO et al., 2010).

Esta espécie é usada também para tratamentos de inflamações ovarianas (AGRA et al., 2007), tratamento de problemas odontológicos (SANTOS et al., 2009). Estudos farmacológicos comprovaram a ação anti-inflamatória (ARAÚJO-NETO et al., 2010, AQUINO et al., 2015), hipoglicemiante e contra bactérias (LEANDRO et al., 2013), fazendo com que *S. obtusifolium* seja considerada uma espécie importante no uso da terapia tradicional (AGRA et al., 2007, BELTRÃO et al., 2008, PEDROSA et al., 2012).

1.7 Atividades biológicas da L-prolina e derivados

Foi identificado a presença de um derivado da L-prolina, a N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina nas folhas da *S. obtusifolium*. A L-prolina é um aminoácido usado para estimular a síntese de colágeno no organismo e também como suplemento dietético (VITAGLIANO et al., 2000, BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2006). E de composto para a síntese de agentes anti-hipertensivos (MASHKOVSKII et al. 1993, NATESH et al., 2004).

Na indústria alimentícia é usada para alimentos e bebidas; também na área agrícola como um agente promotor do crescimento para vegetais e frutas (LEGRANDA et al., 2006). Outros usos incluem a aplicação em cosméticos em cremes como componentes hidratantes.

Sarhan e Seiler (1989) demonstraram os efeitos anticonvulsivantes da L-prolina e derivados em associação com a vigabartina, os autores acreditam que este aminoácido possa estar envolvido com o neurotransmissor glutamato, podendo ser um inibidor ou antagonista de receptor.

A L-prolina pode atuar como uma molécula de sinalização em plantas modulando funções mitocondriais, e na proliferação de células, influenciando na apoptose e regulando as espécies reativas de oxigênio produzidas pelas mitocôndrias, o que pode ser essencial para a recuperação da planta em momentos de estresse oxidativo (SZABADOS; SAVOURE, 2009).

Em um estudo feito em cultura de hepatócitos, realizado por Nakamuf et al.,(1984) indicaram que a L-prolina é essencial para indução da proliferação dos hepatócitos, através do seu efeito sobre a síntese de colágeno intracelular, sendo importante no mecanismo de regeneração hepática e também na patogênese da fibrose hepática e carcinogênese.

2. JUSTIFICATIVA

A inflamação é uma resposta evidente a várias doenças, entender a fisiopatologia deste processo e criar novos alvos terapêuticos que possam modular de forma benéfica este processo, é de essencial importância.

Diante disto o desenvolvimento de pesquisas se torna relevante para a descoberta de novas substâncias com princípios ativos que sejam mais específicos e reduzam os efeitos adversos de vários fármacos já utilizados no mercado.

Assim sendo, o estudo das propriedades fitoquímicas dos vários produtos naturais, são de fundamental importância para descoberta de muitos compostos que posteriormente poderão ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos.

As plantas em especial são ricas em princípios ativos e são promissoras para descoberta de muitas substâncias que podem ser úteis para diversos fins terapêuticos. O Brasil é rico em biodiversidade, portanto pesquisas nesta área são necessárias, podendo assim descobrir nas plantas, tão importantes na cultura popular de moradores de várias regiões do país, importantes fitoterápicos; salientando também a importância da conservação das espécies nativas.

Sideroxylon obtusifolium, popularmente conhecida como quixaba, é uma planta comumente encontrada no bioma da Caatinga, e possui grande uso na medicina popular, para diversos fins terapêuticos (PEDROSA et al., 2012). As pesquisas sobre esta planta ainda são escassas, principalmente em relação ao estudo das folhas, por isso há um interesse de se pesquisar os compostos presentes nesta. A N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina é uma das principais substâncias encontradas nas folhas da quixaba, e sabendo do importante uso desta espécie na medicina alternativa, acreditamos que este derivado de prolina se mostre como uma ferramenta para estudo fisiofarmacológico, e por isso justifica-se o objetivo desta pesquisa.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar o potencial anti-inflamatório e analgésico da N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina (NMP) isolado das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* em modelos experimentais de inflamação e dor e investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da NMP sobre a viabilidade celular de neutrófilos humanos através da atividade metabólica da célula (teste do MTT).
- Estudar o efeito anti-inflamatório através do modelo de edema de pata e peritonite induzido por carragenina em camundongos;
- Realizar análise histológica e imunohistoquímica para TNF- α , iNOS, COX-2 e NF-kB nas patas de animais inflamadas com a carragenina;
- Avaliar o efeito sobre degranulação de neutrófilos *in vitro* pela determinação da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO);
- Verificar a atuação da NMP em modelos de hipernocicepção química (formalina, ácido acético e capsaicina), e mecânica (Von Frey);
- Investigar possíveis mecanismos de ação antinociceptiva como o envolvimento do sistema opióide, sistema α 2-noradrenérgicos e canais de potássio dependentes de ATP (K^+_{ATP});
- Analisar a capacidade antioxidante através do método do DPPH.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias e reagentes

Quadro 1: Drogas e reagentes utilizados

Substância	Origem
Ácido acético	Sigma-Aldrich [®]
Anticorpo iNOS	Santa Cruz Biotechnology Inc (CA, USA).
Anticorpo NF-kB	Santa Cruz Biotechnology Inc (CA, USA).
Anticorpo TNF-alfa	Santa Cruz Biotechnology Inc (CA, USA).
Anticorpo COX-2	Santa Cruz Biotechnology Inc (CA, USA).
Avidina – horseradish peroxidase	Vector, U.S.A
Capsaicina	Sigma-Aldrich [®]
Carragenina	Sigma-Aldrich [®]
Diazóxido	Sigma-Aldrich [®]
Dexametasona	Ache, Brasil
Eosina	Reagen, Brasil
Hematoxilina	Reagen, Brasil
Heparina	Wyeth. U.S.A
DAB	Dako- Dinamarca
PMA	Sigma-Aldrich [®]
Indometacina	Sigma-Aldrich [®]
Formalina	Vetec [®]
Glibenclamida	Sigma-Aldrich [®]
DPPH	Sigma-Aldrich [®]
Morfina	Cristália [®]
Naloxona	Cristália [®]
Vermelho de Rutênio	Sigma-Aldrich [®]
Ioimbina	Sigma-Aldrich [®]

4.2 Material Botânico

A espécie *Sideroxylon obtusifolium* foi coletada no município de Mauriti, Ceará, em setembro de 2014. A exsicata de número 10.648, foi armazenada no "Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima", da Universidade Regional do Cariri (URCA), Ceará, Brasil, após identificação pela Dr. Maria Arlene Pessoa da Silva.

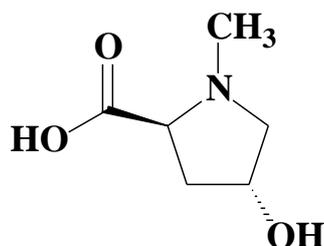
4.3 Estrutura e determinação da N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina

As folhas secas (100 g) foram fervidas durante 15 minutos com 500 mL de água destilada. O material solúvel em água foi liofilizado, obtendo-se 34,86 g de decocto designado SOF-dec (decocto das folhas secas de *S. obtusifolium*). Em seguida 10 g de SOF-dec foram extraídas em aparelho *Soxhlet* com metanol. A solução metanólica foi rota-evaporada sob baixa pressão para se obter 6,76 g de um pó amorfo amarronzado, designado SOF-decM. Alíquotas de um grama (6x) deste SOF-decM foram diluídas em 3,5 mL de água destilada e cromatografadas sobre coluna Phenomenex em fase sólida de extração (SPE), Strata® de fase reversa tubo giga (20 g/ 60 mL), previamente condicionado com metanol e equilibrado com água destilada. As frações (20 mL) deste material cromatografado foram recolhidos, inicialmente usando água como eluente, seguido por uma mistura gradiente de H₂O / MeOH (variando de 10 a 50 %, e em seguida até MeOH) e finalmente, lavou-se com uma solução de THF / MeOH 1:1. Depois de análise por cromatografia de camada delgada (CCD), as frações aquosas foram reunidas e liofilizadas, fornecendo 1,7 g do composto 1.

O composto 1, uma resina marrom escuro: $[\alpha]_{D}^{21} = -31^{\circ}$ (c. 0.1, H₂O), mostrou em seu espectro positivo de massa, íons protonados com pico 246.0872 (C₆H₁₁NO₃,), 168.0655 (Na⁺) e 184.0586 (K⁺). Dados de Ressonância (RMN) foram compatíveis com a estrutura de um derivado de 4-hidroxi-L-prolina. A estrutura sugerida foi confirmada novamente por análises de Ressonância. A estereoquímica relativa de todos os centros estereogênicos foi sugerido com base nos valores de J observados para o padrão de desdobramento de acoplamento escalar e por a análise de espectro NOESY. A estrutura final, incluindo a estereoquímica absoluta, foi realizada a partir da rotação específica negativo do composto 1, e por

comparação com os dados disponíveis na literatura. Assim, o composto 1 foi caracterizado como o N-metil -trans-4-hidroxi-L-prolina com rendimento de 1,7% (Figura 12).

Figura 12: Estrutura química da N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina



N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina

4.4 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), albinos, variedade *Swiss*, machos, de peso entre 25-30g com um número de 10 animais por grupo. Estes foram mantidos acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura entre $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h e com livre acesso à água potável e alimentados com a ração Nuvilab®.

A pesquisa seguiu em conformidade e foi conduzida em obediência as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo seres vivos: animais (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, do NIH - National Institute of Health-EUA, 1996; Lei Federal Nº 11.794/2008; Conselho Nacional de Controle de Experimentação – CONCEA); e integridade da fauna e flora (Lei Federal Nº 9605/1998) (MACHADO et al., 2004). Foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará – UFC, sendo aprovado com o número 02/2015.

4.5 Viabilidade celular através da atividade metabólica da célula (teste do MTT)

O teste do MTT é um método colorimétrico para determinar a viabilidade celular e se baseia no fato do MTT, sal de tetrazólio, de coloração amarela, ser reduzido pelo sistema enzimático succinatotetrazol redutase que forma parte da cadeia respiratória da mitocôndria, a um sal, Formazan, que possui cor púrpura. Assim a ausência da redução do MTT indica uma diminuição da atividade metabólica celular, ou seja, na viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90 %) foram obtidos de sangue humano cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará – HEMOCE (*buffy coat*) e isolados de acordo com o método descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado diversas vezes com soluções salina, utilizando solução de gelatina 2,5% (p/v) para formar um gradiente de separação dos componentes sanguíneos

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C na presença de NMP (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), água destilada, Hanks (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% - controle positivo) em placa de 96 poços e atmosfera de CO₂. Decorrido esse período, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos a 25°C e o sobrenadante descartado e incubada uma nova solução (200 µL) contendo 10% de MTT, na concentração de 10 mg/mL, e estas células foram incubadas novamente por mais 3 horas. Por fim, a placa foi centrifugada novamente nas mesmas condições acima, o sobrenadante foi descartado e adicionado então 150 µL de DMSO puro para a lise das células e solubilização do formazan.

Neste instante, as placas foram agitadas durante 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm. Os experimentos foram realizados em quintuplicata e repetidos em três dias diferentes. Os resultados foram expressos como média das absorbâncias.

4.6 Atividade Anti-inflamatória

4.6.1 Edema de pata induzido pela injeção intra-plantar de carragenina 1%

Para avaliação da atividade antiedematogênica da NMP, foram utilizados grupos de 10 camundongos que tiveram o volume inicial (V_i) da pata posterior direita avaliado por pletismometria. Em seguida foram pré-tratados, por via oral, com veículo: água destilada; indometacina 20 mg/kg (controle positivo) ou NMP nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. Após 1h, os animais receberam carragenina 1% (p/v) (20 μ l/pata) na pata traseira direita. O volume da pata de cada animal foi registrado após 1, 2, 3 e 4 h da injeção do agente flogístico.

A expressão dos resultados foi obtida pela diferença entre o volume final e o volume inicial da pata de cada tempo, calculados na fórmula: $V_e = V_f - V_i$, sendo: V_e = volume do edema (em mL), V_f = volume final e V_i = volume inicial (WINTER, RISLEY; NUSS, 1962).

4.6.2 Peritonite

Com o intuito de avaliar o efeito da NMP na migração de leucócitos, grupos de 10 camundongos foram tratados com o veículo (água destilada), dexametasona 4 mg/kg e NMP 100mg/kg, todos por via oral. Após 60 minutos do tratamento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de carragenina 1%. Após 4 horas, foi avaliada a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal. Para isso, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo injetada na cavidade peritoneal 3ml de PBS heparinizado. Após leve massagem no abdome, uma amostra do lavado peritoneal foi diluída 1:20 em líquido de Türk para contagem de leucócitos totais na câmara de Neubauer (LAPA, 2003). Uma amostra foi levada e centrifugada em uma citocentrífuga (Revan), após isso foram coradas com o panótico rápido para contagem diferencial de neutrófilos.

4.6.3 Imunohistoquímica para TNF- α , iNOS, COX-2 e NF-kB

A imunohistoquímica foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Três grupos de camundongos foram tratados com água destilada, outros dois grupos foram tratados, respectivamente, com NMP (100mg/kg, v.o.) e indometacina (20 mg / kg, v.o). Após 60 minutos, uma injeção subplantar de 20 μ l de solução de carragenina 1% foi administrada na pata traseira direita do animal. Três horas após a aplicação de carragenina, os animais foram eutanaziados e uma amostra de 5 mm do tecido epitelial e conjuntivo da pata traseira direita foi retirada e fixada em formol 10% por 24 h para confecção de lâminas apropriadas para imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6), sob aquecimento em forno de micro-ondas, por 18 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (15 minutos). Os cortes foram incubados durante a noite (4°C) com anticorpo primário de coelho anti-TNF- α , ou anti-iNOS, ou anti-COX-2 ou anti-NF-kB (p.65) diluídos 1:200 em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA), de acordo com o manual de cada fabricante.

Após a lavagem no dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído 1:200 em PBS/BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 30 minutos.

Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas para análise das mesmas. Foram realizadas análises semi-quantitativas (densidade óptica relativa) com o programa Image J (NIH, EUA).

4.6.4 Avaliação Histopatológica

Para verificação das alterações teciduais microscópicas, foram realizados cortes de tecidos epiteliais e conjuntivo de patas de grupos tratados do modelo de edema de pata induzido por carragenina 1% (terceira hora). O tecido foi fixado em formaldeído tamponado

10% e incluído em parafina. Os cortes foram obtidos através de micrótomo 4 μm , corados em lâminas com hematoxilina-eosina e examinados a microscopia óptica. Polimorfonucleares foram identificados e contados em 10 campos no aumento de 400x em microscópio óptico (CAVAZANA et al., 2014).

4.6.5 Determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO) liberado a partir de neutrófilos humanos

Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90 %) também foram obtidos de sangue humano cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará – HEMOCE (*buffy coat*) e isolados da mesma forma do teste do MTT, seguindo o método descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano e Mantovani (1984).

Uma suspensão de neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foi pré-incubada com NMP (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$), indometacina (100 μM), água destilada (veículo) ou solução de Hanks (células não tratadas). A seguir foi adicionado PMA (éster de forbol) (0,1 μM) por 15 minutos a 37°C. Decorridos esse tempo, o material foi centrifugado durante 10 minutos a 4°C.

Aos 50 μl do sobrenadante foram adicionadas solução salina tamponada com fosfato - PBS (100 μL), tampão fosfato (50 μL) e H_2O_2 (0,012%). Após 5 min a 37 °C foi acrescido 20 μL de Tetra metil benzidina (TMB 1,5 mM) e a reação foi interrompida pela adição de 30 μL de acetato de sódio (1,5 M; pH 3,0). A absorbância foi determinada em triplicatas por espectrofotometria (620 nm). Os resultados foram expressos como média das absorbâncias.

4.7 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

4.7.1 Teste da formalina

Os grupos foram compostos de 10 animais e foram utilizados para determinar o efeito da NMP no teste da formalina. Uma hora antes da aplicação da formalina, os camundongos foram tratados com a NMP nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, veículo (água destilada) v.o. Para controle positivo, um grupo foi tratado com a morfina 5 mg/kg, i.p., 30 minutos antes. Após isso foram submetidos a uma injeção de 20 μl de formalina 2 % na pata direita traseira,

sendo logo após a aplicação, colocados individualmente, sob funil de vidro invertido ao lado de um espelho, com a finalidade de facilitar a observação. O tempo transcorrido (em segundos) que o animal lambeu a pata foi registrado em duas fases: inicial (0-5 min) e tardia (20-25 min) após a administração da formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

4.7.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os animais foram divididos em grupos de 10 e tratados com veículo (água destilada, v.o.), NMP (25,50 e 100mg/kg; v.o) ou indometacina (20mg/Kg; v.o). 1 hora depois foi administrado pela via intraperitoneal (i.p), o ácido acético 1% e os animais foram observados durante 30 minutos, sendo contadas o número de contorções abdominais depois de 10 minutos após a aplicação do ácido acético. A contorção abdominal foi identificada como uma contorção do corpo inteiro seguido pela extensão das patas traseiras (KOSTER; ANDERSON; DE BEER, 1959).

4.7.3 Teste da capsaicina

Este modelo avalia a ação de drogas que atuam em receptores vanilóides (TRPV1). Os animais foram divididos em 4 grupos e tratados com veículo (água destilada), NMP (25,50 e 100 mg/kg, v.o.) ou vermelho de rutênio (3 mg/kg, i.p.), como droga padrão. Após 30 ou 60 minutos, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µl da solução de capsaicina (2,2 µg/pata) na pata direita traseira. O tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min, e considerado como um índice de nocicepção (SANTOS, CALIXTO, 1997).

4.7.4 Teste de hipernocicepção mecânica plantar

Os animais foram divididos em grupos (10 animais por grupo) e pré-tratados com veículo (água destilada), NMP (100 mg/kg) ou indometacina (20 mg/kg), todos pela via oral. Todos os grupos de animais receberam 20 μ L de carragenina 1% na pata direita a ser testada logo após a leitura do tempo zero. As respostas comportamentais para o estímulo mecânico foram realizadas com o auxílio do filamento de Von-Frey (diâmetro de 0,8 mm). Os camundongos foram colocados em uma caixa elevada com uma trama de arame no assoalho.

O filamento de Von Frey foi aplicado embaixo da superfície plantar da pata direita traseira (em triplicata com menos de 1 minuto de intervalo) em ordem ascendente de estímulo de força até um valor máximo de 50 g (para evitar lesão na pata). No limiar, o camundongo retira a pata do filamento. Os resultados são apresentados em termos de Variação (Δ) da Intensidade da Hipernocicepção, ou seja, foram calculados pela diferença dos valores das leituras nos tempos (60,120 e 180 minutos) pela leitura do tempo zero (antes da aplicação do indutor da hipernocicepção - carragenina) (CUNHA et al., 2004).

4.8 Mecanismos de ação para nocicepção

4.8.1 Sistema opióide

Para o estudo do possível envolvimento da NMP em receptores opióides, animais foram divididos em grupos de 10. Para este tipo de avaliação administraram-se a naloxona (2 mg/kg, i.p.) 15 min antes da morfina (5 mg/kg, i.p.) ou da NMP (50 mg/kg, v.o.). Outros grupos receberam, o veículo (água destilada) ou morfina ou naloxona ou NMP. Após um período de 30 minutos para os grupos morfina e naloxona e 1 hora para o grupo NMP, os animais foram analisados através do teste de formalina, como descrito anteriormente.

4.8.2 Sistema adrenérgico

O possível papel antinociceptivo da NMP através de receptores α_2 -adrenérgicos foi investigado pela administração de ioimbina (2 mg/kg; i.p.) 15 minutos antes dos animais receberem NMP (50mg/kg) ou clonidina (0,2 mg/kg). Outros grupos receberam, o veículo (água destilada) ou clonidina ou ioimbina ou NMP. Após um período de 30 minutos para os grupos ioimbina e clonidina e 1 hora para o grupo NMP, os animais foram analisados através do teste de formalina, como descrito anteriormente.

4.8.3 Canais de potássio dependentes de ATP

O papel dos canais de potássio dependentes de ATP no efeito antinociceptivo da NMP foi determinado com a administração de glibenclamida (2 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes dos animais receberem NMP (50mg/kg, v.o.) ou diazóxido (3 mg/kg, i.p.). Outros grupos receberam, o veículo (água destilada) ou diazóxido ou glibenclamida ou NMP. Após um período de 30 minutos para os grupos glibenclamida e diazóxido e 1 hora para o grupo NMP, os animais foram analisados através do teste de formalina, como descrito anteriormente.

4.9 Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil- 1-picrilhidrazila) *in vitro*

A atividade antioxidante da NMP e vitamina E (controle positivo) foram determinadas pelo ensaio de DPPH. Foram colocadas 0,1 ml de uma solução de vitamina E (50 μ g/ml) e NMP (10, 25, 50 and 100 μ g/ml), em tubos de ensaio, seguido pela adição de 3,9 ml a 0,3 mM de DPPH em solução metanólica na proporção de 1:1. Os tubos contendo a NMP, vitamina E, solução metanólica de DPPH, e o veículo (DMSO a 30% em solução metanólica na proporção de 1:1) foram submetidos à vigorosa agitação em ambiente escuro por 60

minutos. Como branco, utilizou-se 0,1 ml de uma solução de metanol/etanol (1:1). Após o tempo de reação, a redução do DPPH foi determinada espectrofotometricamente a 517 nm (DE GAULEJAC et al., 1999).

4. 10 Análise Estatística

Os resultados das análises efetuadas foram analisados tomando como base à média e seu correspondente erro padrão da media (E.P.M.). A análise estatística utilizada foi ANOVA com teste *post hoc* Tukey, para ANOVA de uma via, e Bonferroni para ANOVA de duas vias, utilizando o software Prism for Windows (*GraphPad Software*). Foram consideradas diferenças significativas valores de $p < 0,05$.

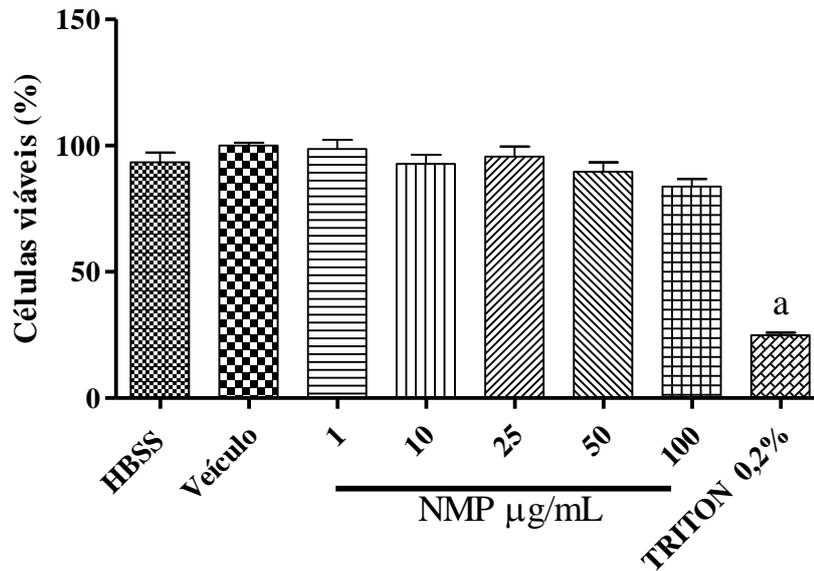
5 RESULTADOS

5.1 Efeito da NMP na viabilidade celular de neutrófilos através da atividade metabólica da célula

Este ensaio é muito utilizado para verificar a citotoxicidade de diversas substâncias, avaliando a atividade metabólica da célula. O MTT é um sal de coloração amarela, reduzido pelo sistema enzimático: succinato tetrazol redutase, que faz parte da cadeia respiratória da mitocôndria, a um sal de cor púrpura o Formazan. Sua diminuição implica na viabilidade celular.

Na figura 13 pode ser observado que a adição da NMP nas concentrações (1, 10,25 50, e 100 $\mu\text{g/mL}$) aos neutrófilos humanos não causou redução da viabilidade celular quando comparado ao veículo, e apenas o Triton 0,2% (padrão citotóxico) apresentou redução da viabilidade celular.

Figura 13: Efeito da NMP sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT



Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com NMP (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste de MTT. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Veículo: Água destilada. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. a: $p < 0,05$ vs Controle (ANOVA e Teste de Tukey).

5.2 Atividade anti-inflamatória

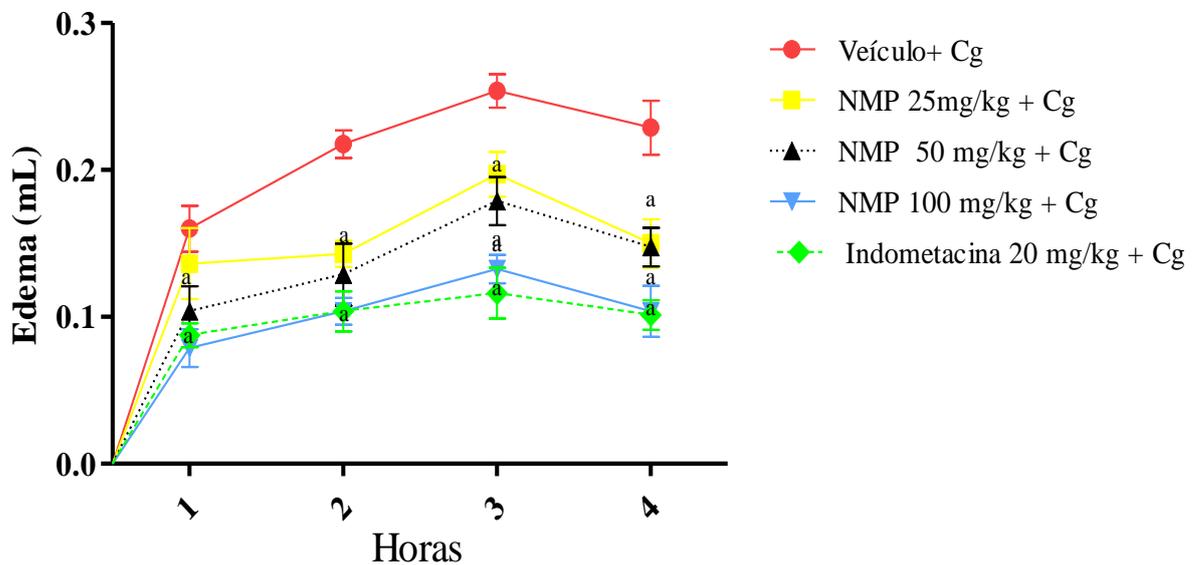
5.2.1 Edema de pata induzido pela carragenina

A NMP nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg reduziu de forma o edema ocasionado pela carragenina 1% em todos os períodos (1-4 hs), como mostra a figura 14 e tabela 1. A indometacina, um anti-inflamatório não esteroideal clássico, foi usado como padrão neste teste e o mesmo, na dose de 20 mg/kg, também reduziu o edema.

Tabela 1: Efeito da NMP no edema de pata por Carragenina 1%

Tratamento	Volume do edema (mL)			
	1hs	2hs	3hs	4hs
Veículo	0.172±0,01	0.217±0,02	0.253±0,02	0.228±0,02
NMP 25 mg/kg	0.088±0,02 ^a	0.134±0,02 ^a	0.177±0,03 ^a	0.150±0,04 ^a
NMP 50 mg/kg	0.087±0,03 ^a	0.135±0,06 ^a	0.170±0,04 ^a	0.149±0,03 ^a
NMP 100 mg/kg	0.078±0,03 ^a	0.111±0,01 ^a	0.132±0,02 ^a	0.115±0,03 ^a
Indometacina 20mg/kg	0.070±0,02 ^a	0.108±0,03 ^a	0.146± 0,05 ^a	0.113±0,05 ^a

Os valores são expressos como média \pm E.P.M da diferença do volume de pata em mL (volume do edema) em relação ao tempo zero. Os animais receberam: veículo (água destilada), NMP (25, 50 e 100 mg/Kg) ou indometacina 20 mg/kg. a: $p < 0,05$ vs veículo (two way ANOVA e teste de Bonferroni).

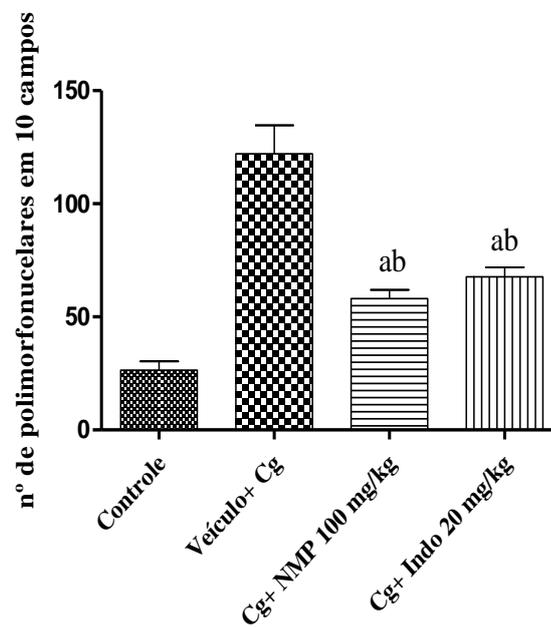
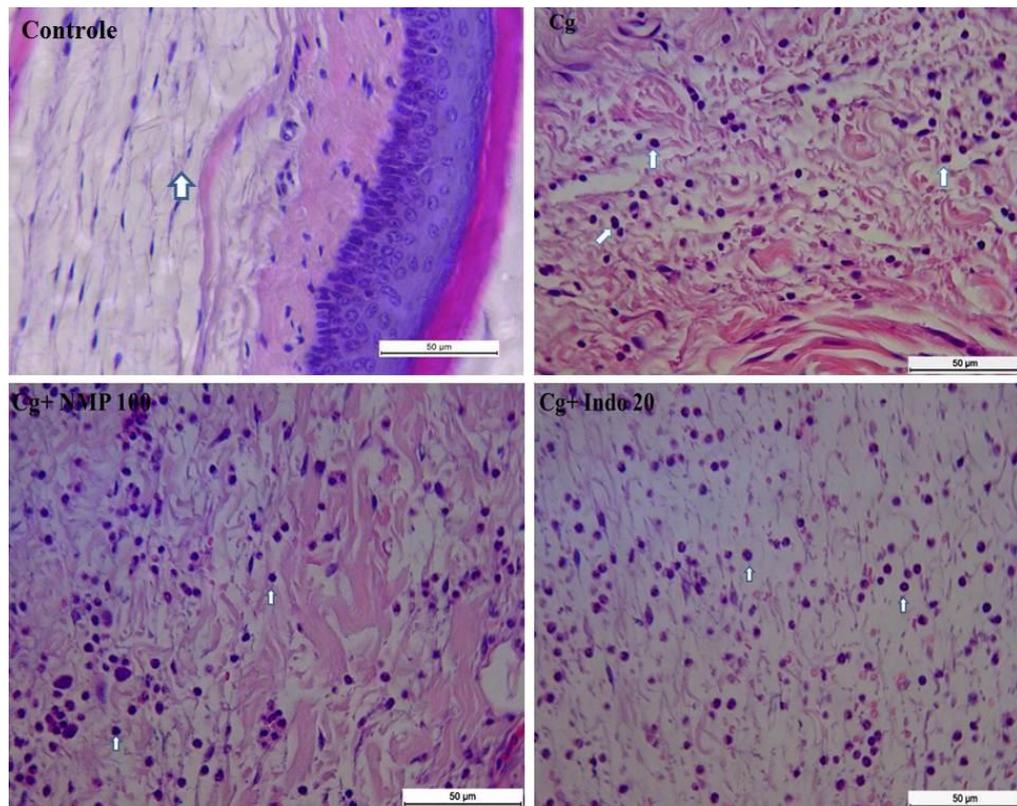
Figura 14: Efeito anti edematogênico da FLP no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. da diferença do volume de pata em ml (volume do edema) em relação ao tempo zero. Os animais receberam: controle (água destilada), NMP (25, 50 e 100 mg/Kg, ou indometacina 20 mg/Kg. a: $p < 0,05$ vs veículo (two way ANOVA e teste de Bonferroni).

5.2.2 Análise histológica das patas de camundongos submetidos ao edema de pata induzido por carragenina

A figura 15 mostra os cortes histológicos das patas dos animais; pode-se evidenciar um intenso infiltrado celular predominantemente polimorfonucleares pela carragenina. No entanto houve uma diminuição dos mesmos nos grupos tratados com a NMP (100 mg/kg) e Indometacina (20 mg/kg).

Figura 15: Fotomicrografias (400x) e contagem de polimorfonucleares em 10 campos

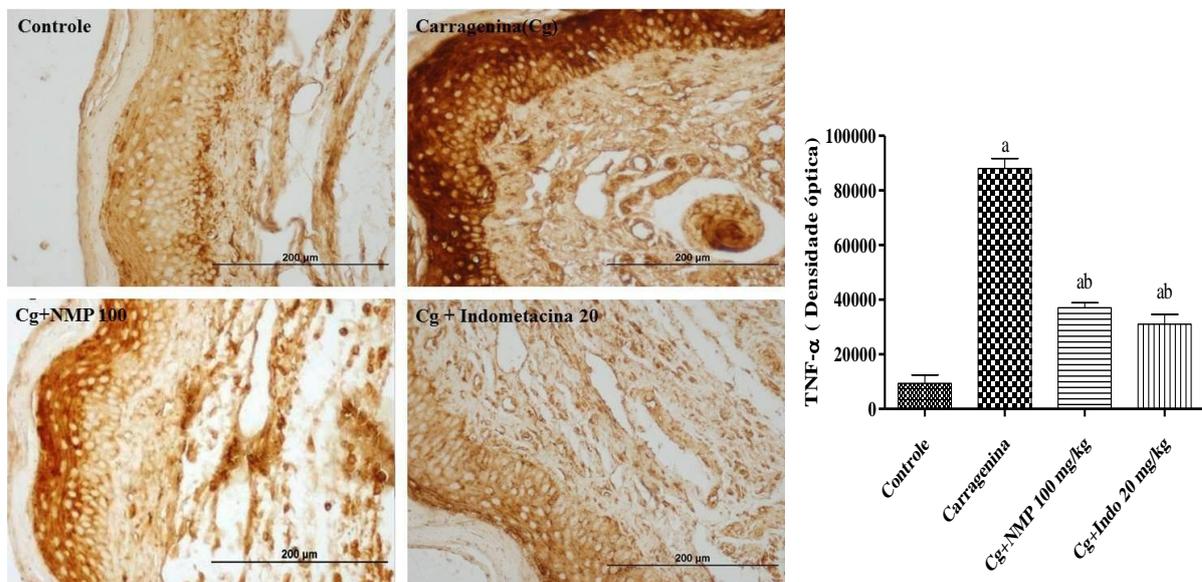


Cortes de tecidos extraídos das patas de camundongos tratados com NMP e indometacina, no teste de edema de pata induzido por carragenina 1%, coradas com Hematoxilina e Eosina. Foi realizada a contagem de polimorfonucleares em 10 campos. Setas indicam os Polimorfonucleares a: $p < 0,05$ vs Controle, b: $p < 0,05$ vs Veículo +Carragenina (ANOVA e teste de Tukey).

5.2.3 Efeito da fração da NMP na marcação imunohistoquímica para TNF- α , iNOS, COX-2 e NF-kB

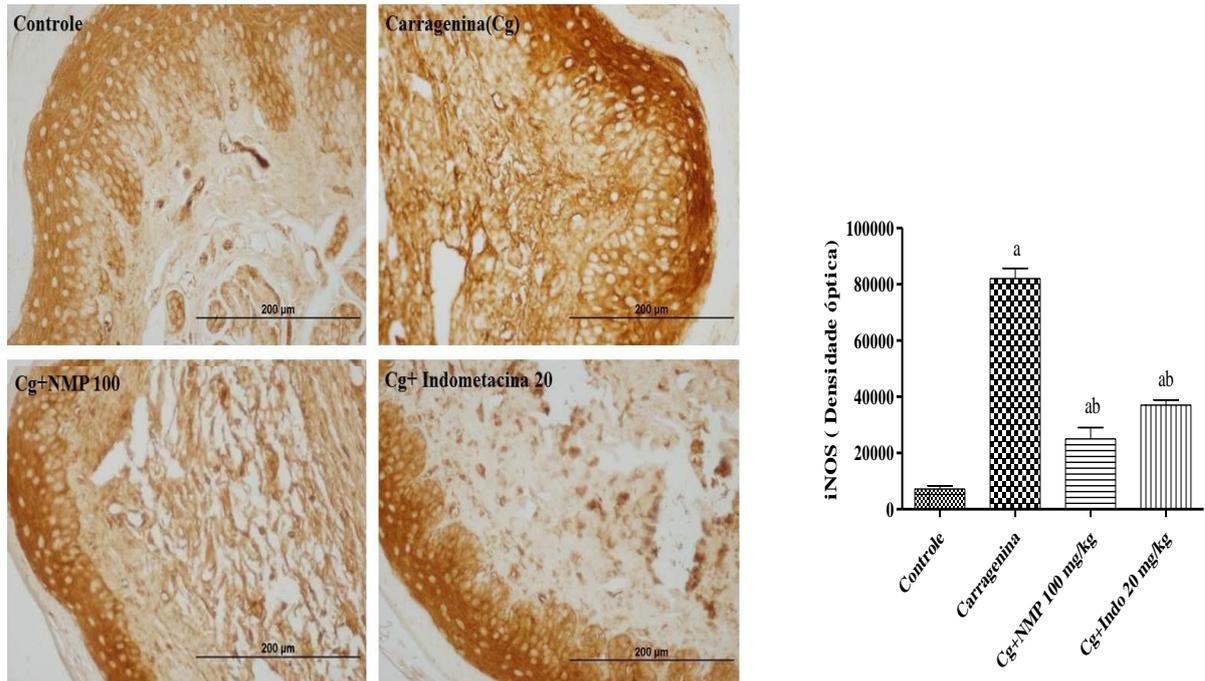
A análise imunohistoquímica dos tecidos conjuntivo e epitelial das patas dos animais inflamadas com a carragenina 1% (terceira hora) mostraram marcação para as enzimas relacionadas à inflamação como o COX-2 e iNOS, como também para o TNF- α , uma importante citocina envolvida nos processos inflamatórios. O NF-kB é uma importante via de sinalização pró-inflamatória, e neste ensaio, mostrou-se também uma intensa marcação, se comparado ao grupo de animais que não sofreram inflamação (controle). No entanto o tratamento com a NMP (100 mg/kg) ou Indometacina (20mg/kg) conseguiu diminuir a expressão de todas as marcações, como é mostrado nas figuras 16,17,18 e 19.

Figura 16 : Fotomicrografias (400x) de imunohistoquímica para TNF- α .



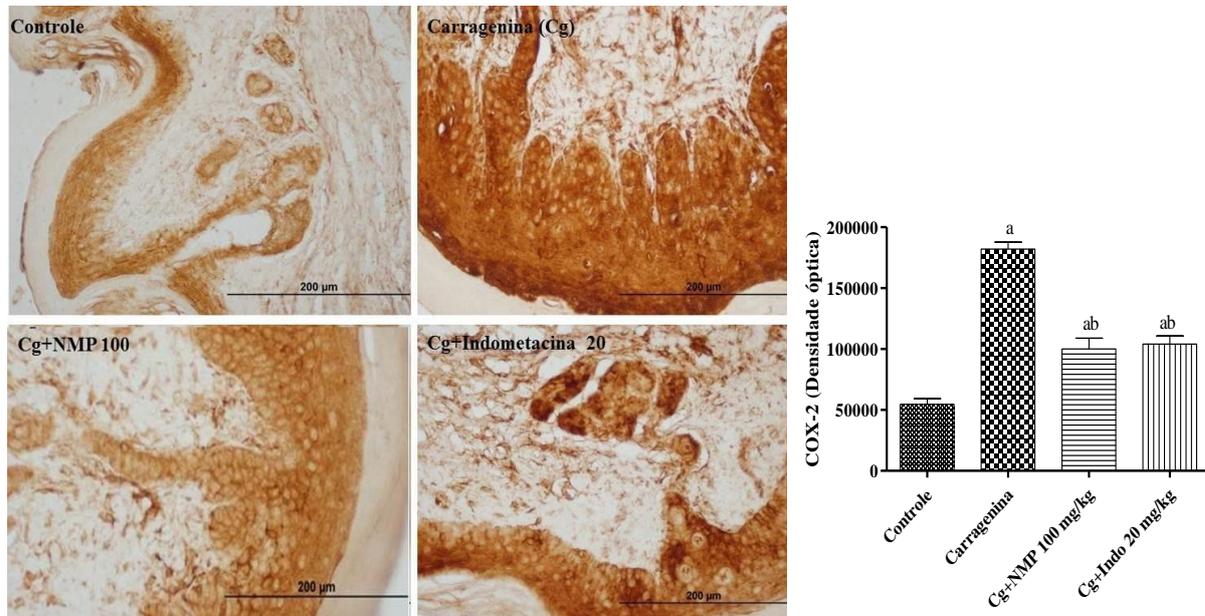
Mensuração de densidade óptica de tecidos extraídos das patas de camundongos tratados com a NMP e indometacina. a: $p < 0,05$ vs Controle, b : $p < 0,05$ vs Carragenina(ANOVA e teste de Tukey).

Figura 17: Fotomicrografias (400x) de imunohistoquímica para iNOS



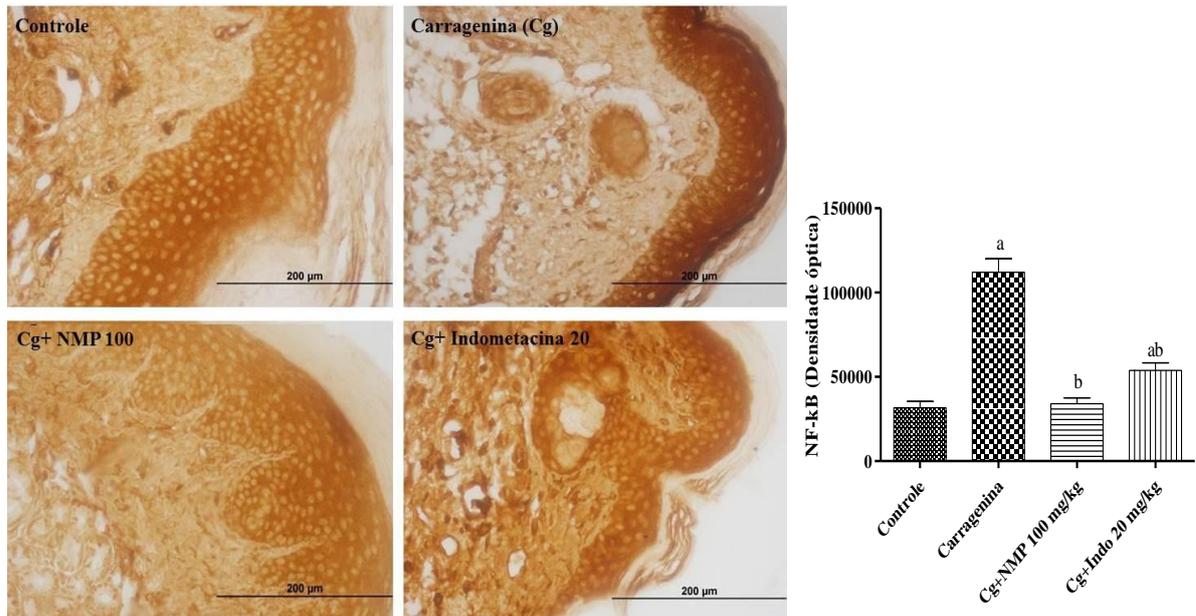
Mensuração de densidade óptica de tecidos extraídos das patas de camundongos tratados com a NMP e indometacina. a: $p < 0,05$ vs Controle, b : $p < 0,05$ vs Carragenina (ANOVA e teste de Tukey).

Figura 18: Fotomicrografias (400x) de imunohistoquímica para COX-2.



Mensuração de densidade óptica de tecidos extraídos das patas de camundongos tratados com a NMP e indometacina. a: $p < 0,05$ vs Controle, b : $p < 0,05$ vs Carragenina(ANOVA e teste de Tukey).

Figura 19 : Fotomicrografias (400x) de imunohistoquímica para NF-kB.

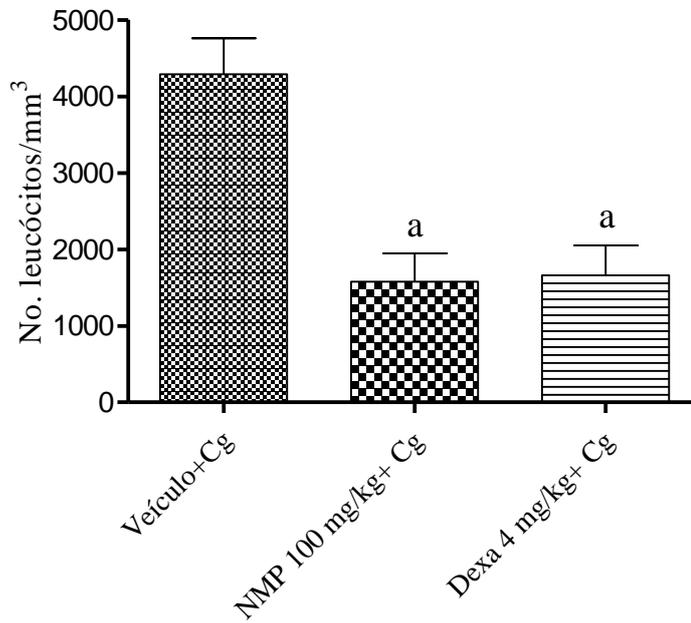


Mensuração de densidade óptica de tecidos extraídos das patas de camundongos tratados com a NMP e indometacina. a: $p < 0,05$ vs Controle, b : $p < 0,05$ vs Carragenina(ANOVA e teste de Tukey).

5.2.4 Peritonite induzida por carragenina em camundongos

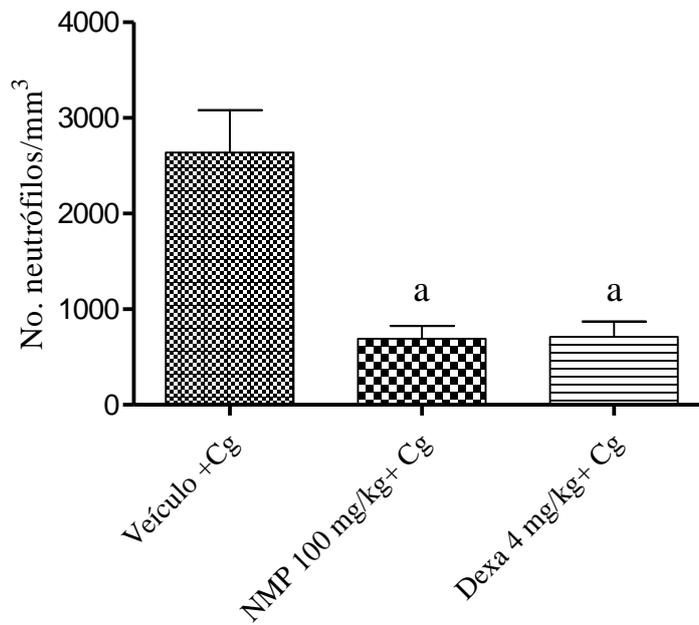
A peritonite foi induzida pela administração intraperitoneal de carragenina. Houve uma intensa infiltração de leucócitos no grupo controle e uma diminuição significativa destes quando os animais foram tratados com a NMP (100mg/kg), com uma redução de 77% ou Dexametasona (4 mg/kg), reduzindo 72% bem como do número de neutrófilos (73 e 72%, respectivamente), quando comparados com o grupo que recebeu o veículo. Esses achados demonstram uma inibição das células envolvidas no processo inflamatório promovido pela carragenina. Figura 20 e 21.

Figura 20: Efeito da administração da NMP 100mg/kg sobre a migração de leucócitos na peritonite induzida por carragenina medida pela contagem de leucócitos totais no fluido peritoneal.



Os resultados representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) a: $p < 0,05$ vs Controle carragenina (ANOVA e Teste de Tukey).

Figura 21: Efeito da administração da NMP 100mg/kg sobre a migração de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina medida pela contagem diferencial de neutrófilos no fluido peritoneal.

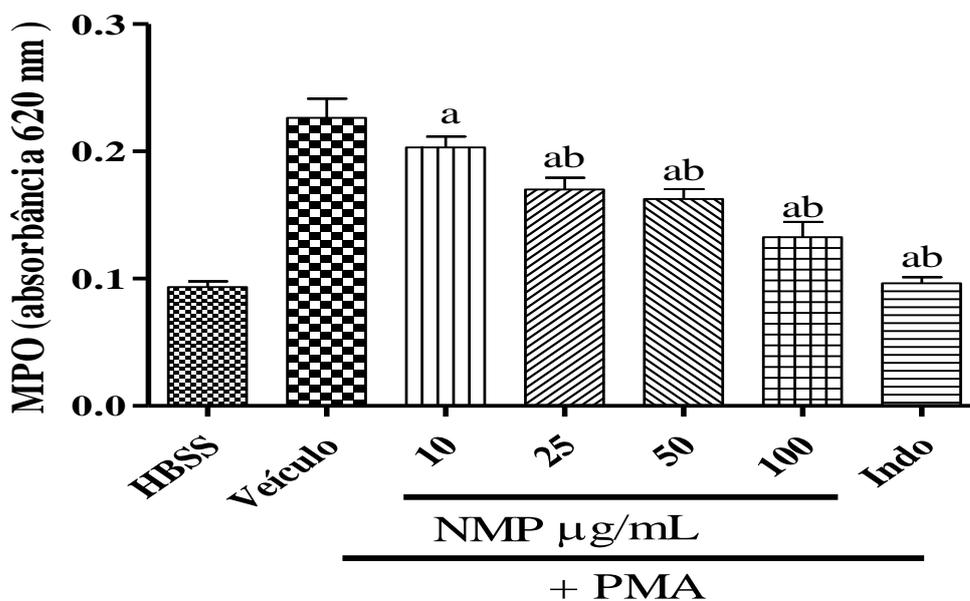


Os resultados representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) a: $p < 0,05$ vs Controle carragenina (ANOVA e Teste de Tukey).

5.2.5 Efeito da NMP na degranulação de neutrófilos humanos induzida por PMA: atividades da enzima mieloperoxidase (MPO)

A enzima mieloperoxidase, um biomarcador da inflamação, está presente em grânulos de leucócitos como neutrófilos e macrófagos. Neste ensaio de cultura primária de neutrófilos a NMP nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu cerca de 20, 31 e 40% respectivamente a atividade da MPO liberada por neutrófilos estimulados pelo PMA em relação aos controles, como é mostrado na figura 22.

Figura 22: Efeito da NMP na degranulação de neutrófilos humanos estimulados pelo PMA, determinados pela atividade da mieloperoxidase (MPO).



Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. da absorbância da atividade da enzima mieloperoxidase. Os resultados obtidos na presença da NMP (10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) e Indometacina (100 μM) foram comparados em relação ao veículo e a solução de Hanks (HBSS). As análises foram realizadas em triplicata e repetidas em três dias diferentes; a: $p < 0,05$ vs (solução de Hanks); b: $p < 0,05$ vs veículo (água destilada) (ANOVA e Teste de Tukey).

5.3 Atividade antinociceptiva

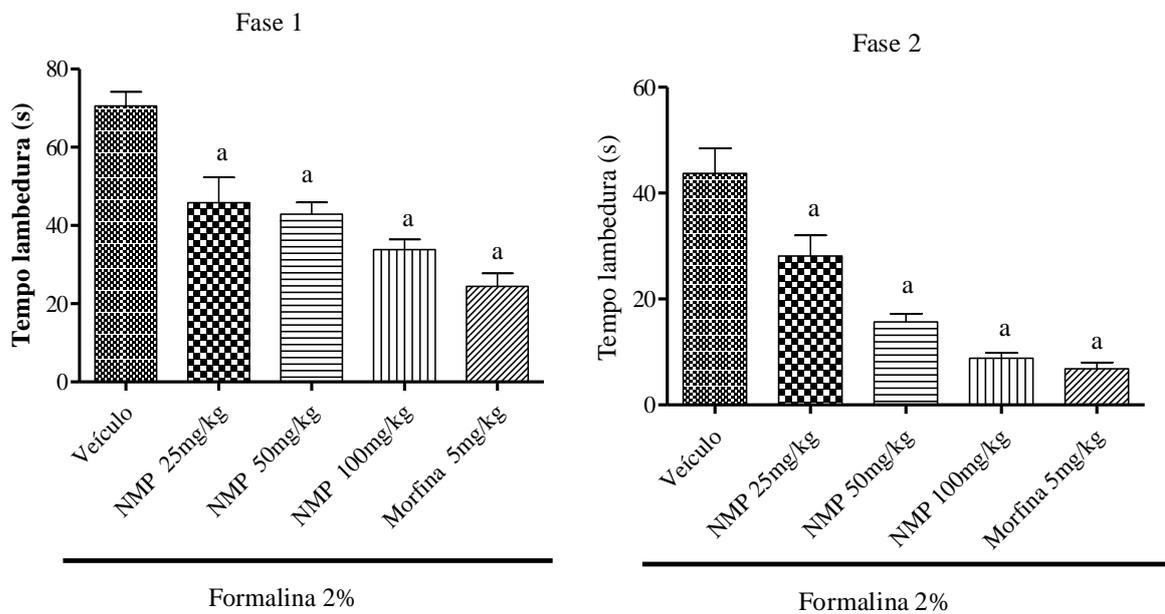
5.3.1 Teste da Formalina

A figura 23 mostra que a administração da NMP nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg foi capaz de reduzir o tempo de lambertura da pata injetada com formalina durante a primeira fase

do teste (0-5 minutos) em relação ao grupo controle. O mesmo foi visto na segunda fase (20-25 minutos), reduzindo de forma significativa o tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata em relação ao grupo que recebeu como tratamento apenas com o veículo (água destilada).

Os valores de inibição causada pela administração da NMP nas doses de 25,50 e 100 mg/kg, v.o., foram, respectivamente, 35 e 42 e 52% na primeira fase ,e de 30 e 61 e 78 % na segunda fase. A morfina 5 mg/kg,i.p., um analgésico opióide, foi capaz de diminuir significativamente o tempo de lambedura da pata em ambas as fases do teste (83%).

Figura 23: Efeito da NMP 25,50 e 100mg/kg sobre o tempo de lambedura da pata traseira direita na primeira e segunda fase do teste de formalina



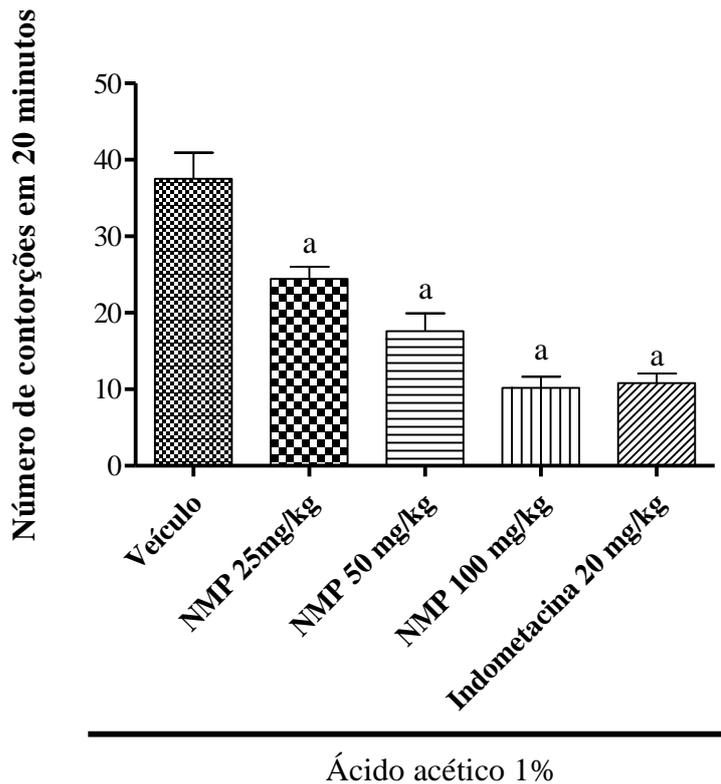
Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o tempo de lambedura das patas traseiras direitas. a: $p < 0,05$ vs controle (ANOVA e Teste de Tukey).

5.3.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

A administração da NMP nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg reduziram significativamente a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético 1% com inibição de (34, 53 e 72 % respectivamente), em relação ao grupo controle que recebeu como pré-tratamento apenas com o veículo. O grupo pré-tratado com a indometacina, utilizado como droga de

referência, apresentou uma redução de 71% no número de contorções, como mostrado na figura 24.

Figura 24: Efeito da NMP 25,50 e 100mg/kg sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.

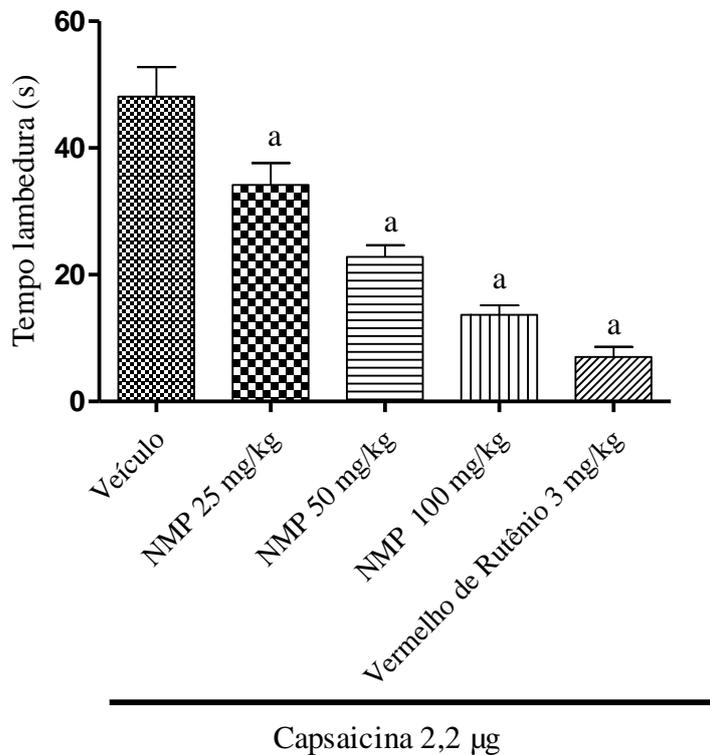


Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o número de contorções induzidas pelo ácido acético. a: $p < 0,05$ vs controle (ANOVA e teste de Tukey).

5.3.3 Teste da Capsaicina

A participação do envolvimento dos receptores TRPV1 sensíveis a capsaicina foi evidenciado pela aplicação de capsaicina (2,2 μ g) na pata traseira do animal. Como ilustrado na figura 25, observa-se um efeito antinociceptivo da NMP de forma dose dependente do tempo de lambadura após receberem capsaicina na pata. O mesmo efeito foi observado em outro grupo de animais quando estes receberam vermelho de rutênio 3mg/kg (antagonista não seletivo de receptores vanilóides).

Figura 25: Envolvimento da NMP no modelo de lambedura da pata induzida por capsaicina.

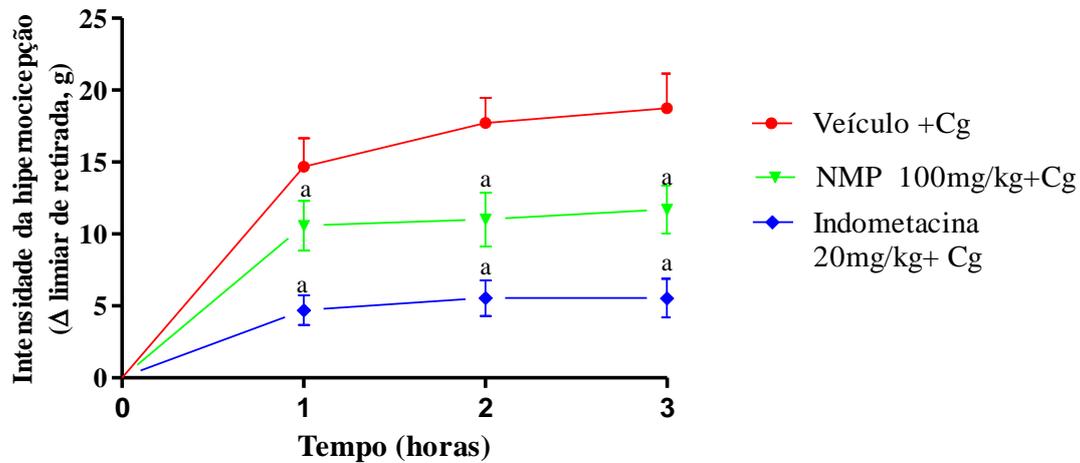


Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de lambedura. a: $p < 0,05$ vs Veículo (ANOVA e teste de Tukey).

5.3.4 Hipernociceção Mecânica Plantar

O pré-tratamento com a dose de 100mg/kg da NMP antes da indução do estímulo pela carragenina, foi capaz de prevenir a hipernociceção em todos os tempos de mensuração do experimento, com aumento significativo do limiar de dor quando comparado ao grupo do veículo. A indometacina, também foi capaz de inibir a hipernociceção em todos os tempos do experimento de forma significativa (Figura 26).

Figura 26: Efeito da NMP 100mg/kg sobre a hipernociceção mecânica plantar induzida por carragenina 1% em camundongos.



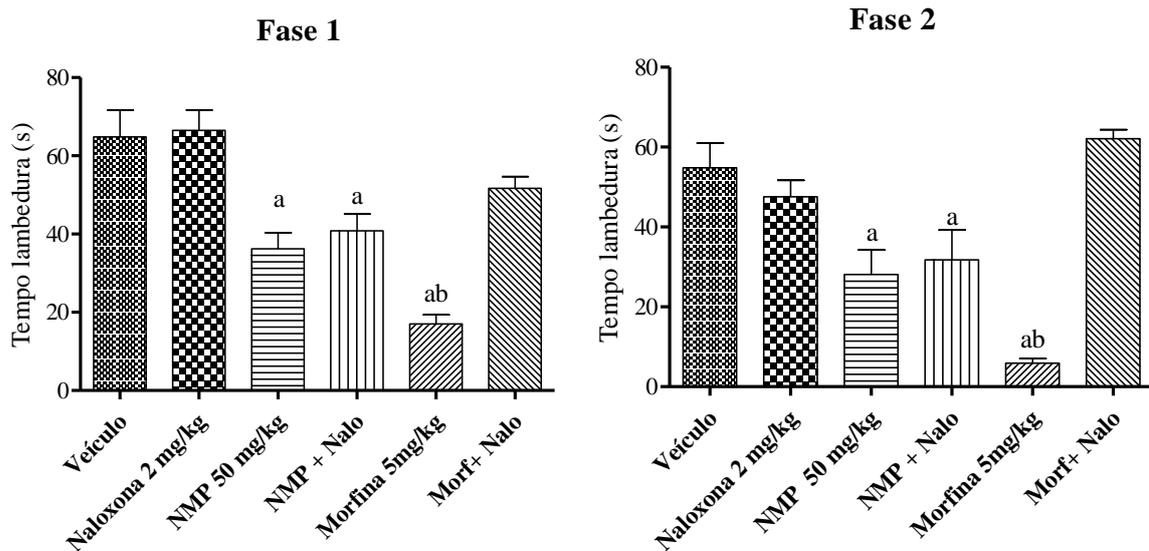
Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para limiar de retirada da pata em grammas (intensidade da hipernociceção) para grupos de 10 animais. a: $p < 0,05$ vs Veículo(two way ANOVA e teste de Bonferroni).

5.4 Mecanismos de ação para atividade antinociceptiva

5.4.1 Investigação da participação dos receptores opióides

O pré-tratamento dos animais com naloxona 2mg/kg não foi capaz de alterar o efeito antinociceptivo da NMP na dose de 50mg/kg, contudo bloqueou o efeito antinociceptivo da morfina 5mg/kg que foi o analgésico opióide usado como referência. (Figura 27).

Figura 27: Estudo do envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da NMP no modelo de nocicepção induzido pela formalina.

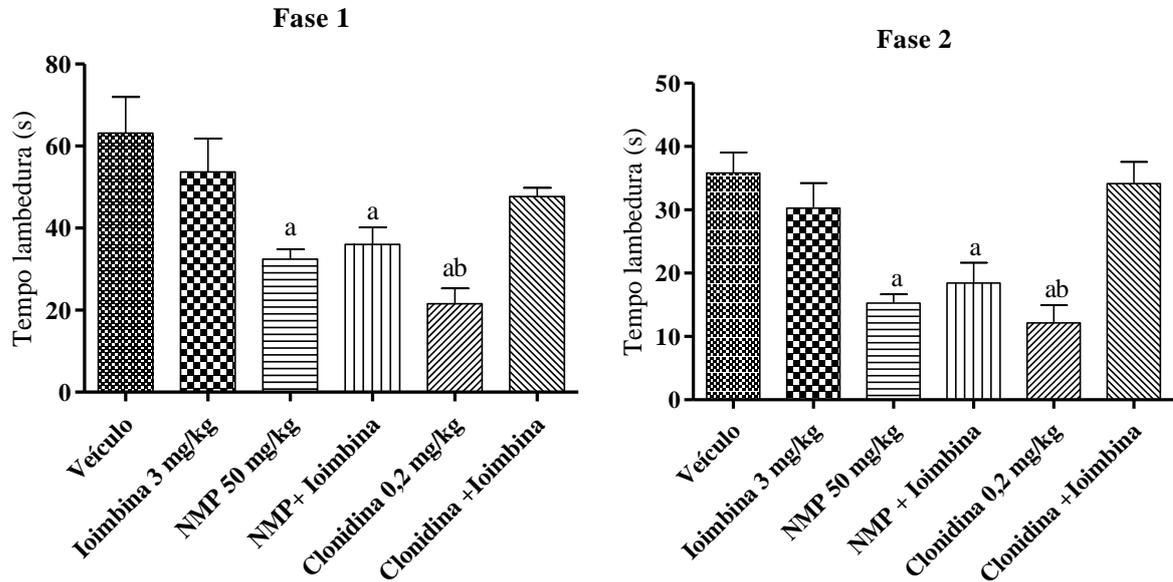


Os valores representam a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) para o número de comportamentos de nocicepção exibidas pelos animais. a: $p < 0,05$ vs veículo; b: $p < 0,05$ vs Morfina + Naloxona(ANOVA e teste de Tukey).

5.4.2 Investigação da participação de receptores α_2 adrenérgicos

O bloqueio dos receptores α_2 -adrenérgico após o pré-tratamento com ioimbina não alterou o efeito antinociceptivo da NMP 50mg/kg. De forma contrária a ioimbina 3mg/kg diminuiu significativamente o efeito antinociceptivo da clonidina 0,2 mg/kg que é um agonista α_2 utilizado como referência (Figura 28).

Figura 28: Envolvimento dos receptores α_2 -adrenérgicos no efeito antinociceptivo da NMP no modelo de nociceção induzidas pela formalina em camundongos.

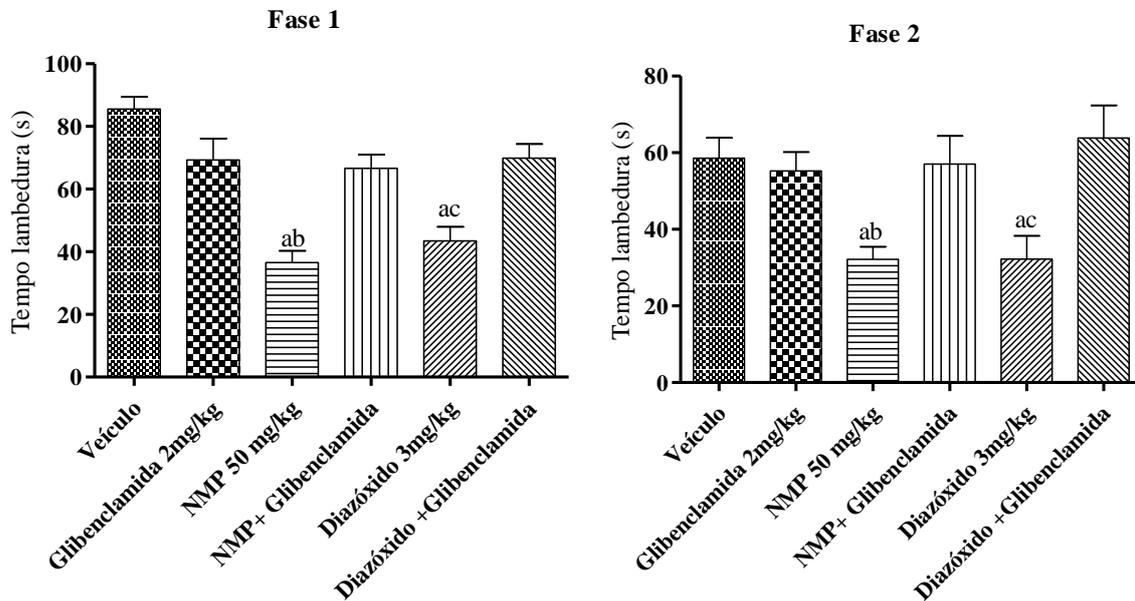


Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de número de comportamentos de nociceção exibidas pelos animais. a: $p < 0,05$ vs Veículo e b: $p < 0,05$ vs Clonidina + ioimbina (ANOVA e teste de Tukey).

5.4.3 Participação dos canais de potássio dependentes de ATP

A figura 29 mostra que o pré-tratamento com glibenclamida 2mg/kg, promoveu a reversão parcial do efeito antinociceptivo no grupo que recebeu a NMP 50mg/kg nas duas fases do teste, quando comparado com o grupo que recebeu apenas a NMP 50mg/kg. O mesmo efeito foi observado quando na co- administração da glibenclamida com o diazóxido 3mg/kg.

Figura 29: Envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP no efeito antinociceptivo da NMP no modelo de nociceção induzida pela formalina em camundongos.

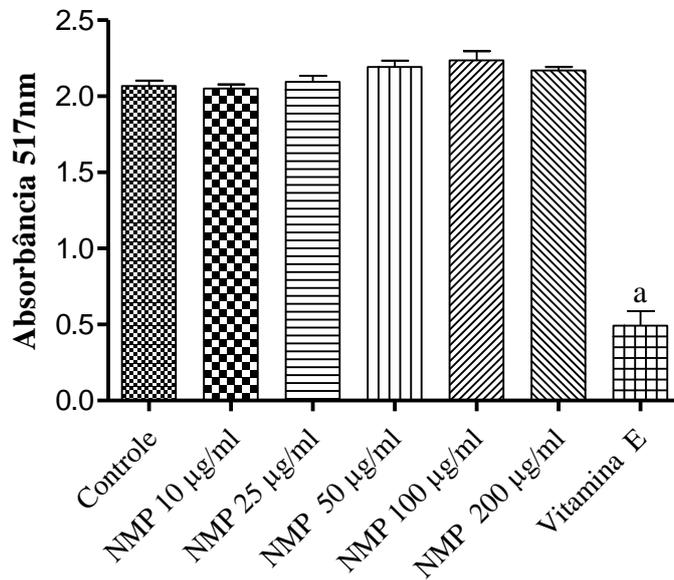


Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos de nociceção exibidas pelos animais. a: $p < 0,05$ vs Veículo, b: $p < 0,05$ vs NMP+ Glibenclamida, c: $p < 0,05$ vs Diazóxido +Glibenclamida (ANOVA e teste de Tukey).

5.5 Avaliação da atividade antioxidante da NMP através do teste de DPPH

Os resultado mostrado na figura 30 mostra que a NMP, nas concentrações de 10, 25, 50,100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, não apresentam qualquer capacidade sequestradora de radicais livres. Ao contrário da vitamina E, utilizada como padrão positivo, diminuiu significativamente o valor de absorbância, em relação aos controles.

Figura 30: Capacidade antioxidante da NMP pelo teste de DPPH. Os valores representam à média \pm E.P.M. da absorbância.



Os resultados obtidos na presença das drogas testes foram comparados em relação ao controle (padrão negativo). As análises foram realizadas em triplicatas; a $p < 0,05$ vs controle (ANOVA e Teste de Tukey).

6. DISCUSSÃO

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças inflamatórias são a terceira maior causa de mortes, responsáveis por cerca de 3,46 milhões de óbitos, representando 10,8% do total de mortes (WHO, 2012). E está cada vez mais evidente que medicamentos que combatam múltiplos alvos tornam-se mais eficazes do que os que atuam sobre um único fator-chave, diminuindo efeitos colaterais e adversos (MORPHY; RANKOVIC, 2005, MARMITT et al., 2015).

Nesse contexto as espécies vegetais utilizadas na medicina popular, têm contribuído ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos. Para isso, o conhecimento das classes de componentes químicos se torna necessário para fornecer a relação dos princípios ativos. E uma vez detectada a presença de determinados metabolitos secundários, o estudo biológico é direcionado (FIGUEREDO et al. , 2013, FLOGIO et al., 2006).

Deste modo a pesquisa de produtos naturais poderá sugerir uma aplicabilidade biotecnológica das plantas por possuir uma série de metabólitos ainda não estudados. A N-metil-trans-4-hidroxi-prolina isolado das folhas da quixaba (*S. obtusifolium*), foi um metabólito bastante encontrado nesta parte da planta que é muito importante na medicina alternativa.

A avaliação da citotoxicidade da NMP foi realizada em neutrófilos através do teste do MTT. Neste ensaio a NMP ao contrário do Triton X-100 (droga padrão, citotóxica), não interferiu na viabilidade celular em relação ao veículo e HBSS (células não tratadas), sugerindo ausência de toxicidade sobre o metabolismo celular, particularmente relacionado à atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase.

Foram vistos neste estudo efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos da NMP. Dentre os protocolos utilizados para a avaliação de compostos de origem natural com possível ação anti-inflamatória, destaca-se o edema de pata ocasionado pela aplicação de carragenina.

A carragenina desencadeia um intenso processo inflamatório. Na primeira hora após a injeção de carragenina o aumento da permeabilidade vascular é geralmente mediado por histamina e serotonina. Na segunda hora, o aumento da permeabilidade é mediado por cininas como a bradicinina, bem como no recrutamento de citocinas como o TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IFN- γ (DE SMET, 1997, MORRIS,2003).

A fase de maior intensidade do edema está na terceira e quarta hora após a sua aplicação e caracteriza a ação de prostaglandinas sobre a permeabilidade capilar em especial a PGE₂. Há também um aumento do óxido nítrico e um intenso infiltrado de polimorfonucleares, em especial os neutrófilos (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971, MONCADA; HIGGS,1993, FIELDS; BASBAUM, 1999).

O tratamento com todas as doses da NMP causou redução do edema de pata em todas as horas(1-4hs) e diminuição da infiltração de polimorfonucleares (3hs),evidenciado na análise histopatológica das patas. Estes efeitos podem ter sidos desencadeados por uma possível diminuição dos mediadores pró-inflamatórios: TNF- α , NF-kB, iNOS e COX-2 como demonstrado nos ensaios imunohistoquímicos.

Sabe-se que o TNF- α é a primeira citocina a ser liberada, de modo que é considerada a citocina-chave do processo inflamatório. Após sua liberação, o TNF- α induz a secreção de IL-1 β pelas células presentes e, conseqüentemente, de prostaglandinas (PGs). Além disso, o TNF- α também estimula uma outra via biológica dependente da liberação das quimiocinas CINC-1/CXCL1 (em ratos, experimentalmente) ou IL-8/CXCL8 (CUNHA et al., 1992).

Após a ativação de TNF- α , a cascata de sinal subsequente pode promover a ativação do NF- κ B (XIAO, 2004). O NF- κ B é considerado uma via de sinalização pró-inflamatória, com base no seu papel na expressão de genes pró-inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, e tem um papel central em um grande número de doenças inflamatórias (BALDWIN, 2001, LAWRENCE, 2009). Já se sabe que o NF- κ B está envolvido na ativação da iNOS e COX-2 (HAN et al., 1998).

A redução dos níveis do NO através da inibição da i-NOS também é um dos mecanismos relacionados à diminuição do edema de pata induzida por carragenina (PARK et al., 2007). Evidências indicam que o óxido nítrico atua como mediador pró-nociceptivo na inflamação juntamente com as prostaglandinas (TORIYABE et al., 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem uma interação de NO e PG, mostrando que a produção de PGE₂ é aumentada ainda mais na presença de NO. A inibição da produção de NO por inibidores da enzima óxido nítrico sintetase parece diminuir a produção de PGE₂ (SALVEMINI et al., 1995, CHEN; LEVINE, 1999).

Outros estudos indicaram que a administração de inibidores não seletivos de NO suprime a expressão de COX-2 na inflamação induzida por carragenina (TORIYABE et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que AINEs como o ácido acetil salicílico diminuem a expressão do NF- κ B, diminuindo, a degradação dos I κ Bs e inibindo a IKK na competição pelo receptor da adenosina trifosfato (ATP) no IKK β (KOPP, GHOSH, 1994, YIN; YAMAMOTO; GAYNOR 1998).

Entretanto, foi visto que a indometacina e ibuprofeno são mais eficazes do que o ácido acetil salicílico na inibição da ativação do NF- κ B, via TNF- α , em linhagens celulares leucêmicas (TAKADA et al., 2004). A administração crônica da indometacina (10mg/kg) também reduziu a formação de placas beta-amiloides em camundongos, através do bloqueio da NF- κ B, podendo esta droga atenuar o processo inflamatório ocasionado pela doença de Alzheimer (SUNG et al., 2004).

A talidomida inibiu o NF- κ B pelo bloqueio de sinalização de TNF- α e IL-1 β , por meio de um mecanismo que envolve a supressão de IKK (ARMOIRY, AULAGNER, FACON, 2008). Baseado nestas informações pode-se sugerir que os efeitos anti-inflamatórios da NMP, são semelhantes aos destas drogas, principalmente pela redução do TNF- α .

O modelo de peritonite induzido pela carragenina também induz uma significativa resposta inflamatória 4 horas após a indução. Nesta fase, como no edema de pata, ocorre um

aumento de leucócitos do tipo polimorfonucleares, aumento do TNF- α e IL-1 β , de metabólitos do óxido nítrico, prostaglandinas e ainda aumento da exsudação peritoneal e sistêmica (DAMAS et al, 1990).

O tratamento com a NMP mostrou uma diminuição do número de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais, em especial de neutrófilos. Araujo-Neto et al., (2010) obtiveram resultados semelhantes a deste estudo, através do tratamento de animais com o extrato etanólico da casca de *Sideroxylon obtusifolium*, nas doses de 100,200 e 400 mg/kg. Houve uma diminuição do edema de pata e da migração de leucócitos no fluido peritoneal de animais submetidos a aplicação da carragenina.

Corroborando com estas informações, Aquino et al., (2016) estudaram o extrato metanólico das folhas de *S. obtusifolium* na inflamação aguda, através dos modelos de edema de orelha induzido por óleo de cróton e fenol. E este extrato, nas concentrações de 25 e 50mg, mostrou efeito antiedematogênico.

Na avaliação da redução da enzima mieloperoxidase (MPO), o PMA (forbol-miristatoacetato), foi utilizado como estímulo de ativação neutrofílica. Os resultados obtidos mostraram que o PMA induziu a ativação de neutrófilos, observada pela liberação expressiva de MPO no meio, no entanto houve uma redução pela NMP.

O PMA é um composto sintético que ativa a transdução de sinais no neutrófilo (THELEN et al., 1993). A MPO é uma hemoproteína presente em grânulos azurófilos de neutrófilos e monócitos/macrófagos. Tem a função de catalisar a produção do ácido hipocloroso e a oxidação de substratos endógenos, além de recrutar citocinas. A MPO tem sido correlacionada com alguns dos efeitos deletérios durante o processo inflamatório (KUMAR et al, 2004)

Pereira et al., (2013), utilizando o modelo de cistite induzida por ciclofosfamida em ratos, observaram que o extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* na dose de 200mg/kg, diminuiu atividade da MPO em tecidos de bexiga. Leite et al., (2015) também observaram redução da MPO e do número de polimorfonucleares em feridas cutâneas de animais tratados topicamente com o extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* (30 mg), após 48 h da indução da ferida.

Outro derivado de prolina (oxaceprol, N-acetil-L-hidroxi prolina), apresentou propriedades anti-inflamatórias na terapia da osteoartrite com eficácia equivalente à de diclofenaco (BAUER et al., 1999, HERRMANN et al., 2000, VEIHELMANN et al., 2001, KRUGER et al., 2007).

Um dos métodos para investigação da atividade antinociceptiva da NMP foi através do modelo de contorções abdominais induzido pelo ácido acético. Este teste é considerado um modelo geral para atividade antinociceptiva, visto que a ação do ácido acético provoca uma liberação de vários mediadores como a substância P, bradicininas, prostaglandinas, bem como das citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF-alfa, não sendo tão viável para estabelecer mecanismos de ação de novas drogas (COUTO et al., 2011, PINHEIRO et al., 2011, SILVA et al., 2013).

Têm-se associado que neste método existe a liberação de prostanoídes, em geral, níveis elevados de PGE₂ e PGF₂α, bem como produtos da lipoxigenase em fluidos peritoneais (SILVA et al., 2013). Apesar de ser um modelo inespecífico, pode ser utilizado como triagem para drogas com possível atividade analgésica e a partir dele, verificar os mecanismos de ação envolvidos nesta ação.

Outro teste muito utilizado para medir a efetividade de agentes antinociceptivos é o da formalina. A vantagem deste sobre o de contorções é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor, vista em duas fases: fase inicial aguda (0 a 5 minutos) e tardia (20 a 25 minutos) após o período entre as fases, denominado intervalo de quiescência (HUNSKAAR; HOLE, 1987, RANDOLPH, 1997, MARTINS et al., 2006).

A primeira fase é conhecida como dor neurogênica ou aguda, estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo Aδ e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase (inflamatória) está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, serotonina, e outros (HUNSKAAR; HOLE, 1987, SHIBATA et al., 1989, SILVA et al., 2013).

A NMP diminuiu o número de lambeduras neste ensaio nas duas fases, principalmente na fase inflamatória, fortalecendo ainda mais a hipótese que esta droga diminui citocinas e enzimas pró-inflamatórias. Semelhante a estes dados o tratamento de animais com o extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* também reduziu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e a segunda fase no teste da formalina (ARAUJO-NETO et al., 2010).

Baseado nisto foi realizado o teste do Von-Frey, um método para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, bastante utilizado na clínica e passou a ser utilizado para experimentos laboratoriais, no sentido de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais (CUNHA et al., 2004).

A NMP aumentou o limiar de dor ocasionado pelo estímulo mecânico nas patas dos animais com hiperalgesia ocasionadas pela carragenina. Drogas com ação anti-inflamatória funcionam bem neste modelo visto que a inibição dos mediadores inflamatórios diminuiu efetivamente a hiperalgesia (VERRI-JÚNIOR et al., 2005).

Foi visto alguns possíveis mecanismos de ação antinociceptiva da NMP, utilizando-se de meios farmacológicos como antagonistas e agonistas específicos. A NMP não demonstrou atividade antinociceptiva envolvendo receptores opióides e alfa-2 adrenérgicos.

Diferente disto a NMP mostrou-se eficaz em reduzir a nocicepção medida pela capsaicina (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonamida) nos receptores vanilóides do tipo TRPV1. A capsaicina é um agonista deste receptor, sua ligação faz com que haja uma estimulação de fibras aferentes do tipo C, responsável pela nocicepção observada (MASON, 2004).

A ativação dos TRPV1, pela capsaicina, no neurônio sensitivo primário leva ao influxo de cálcio e sódio. Por sua vez, esses aferentes ativados liberam glutamato, substância P, neurocinina A, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, óxido nítrico e mediadores pró-inflamatórios. A ativação do TRPV1 pode ser potencializada por agentes pró-inflamatórios e fatores tróficos (PREMKUMAR; ABOOJ, 2013).

Os canais de potássio sensíveis ao ATP são canais de ligação importantes na excitabilidade da membrana da célula e para seu estado celular bioenergético. Eles controlam o potencial de repouso das células neuronais e estão envolvidos na recuperação da voltagem após o disparo de potenciais de ação. Evidências sugerem que os mediadores inflamatórios são capazes de modulá-los, acarretando o seu fechamento e a alteração do potencial de repouso das células neuronais; conseqüentemente aumento da excitabilidade (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004).

A abertura dos canais de potássio ATP dependentes, induz hiperpolarização da célula, diminuição dos níveis de Ca^{++} intracelular e liberação de neurotransmissores contribuindo para a antinocicepção (OCANA et al., 2004). A glibenclamida reverteu o efeito da NMP e do diazóxido, sugerindo um possível envolvimento nestes canais.

Outros estudos têm associado que derivados de prolina tenha efeito antagonista em receptores de glutamato como o NMDA ou mesmo na inibição do próprio receptor (KELLER et al., 1981, SARHAN; SEILER 1989). Como se sabe o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido na transmissão do sinal nociceptivo e este induz uma resposta nociceptiva através da sua atuação em receptores glutamatérgicos que estão presentes em sítios de ação periférica, espinhal e supra-espinhal (BEIRITH et al., 2002).

Para avaliar a atividade antioxidante da NMP utilizou-se o método do DPPH e a mesma não apresentou efeitos antioxidantes neste teste. Este método é um modelo geral para avaliar a capacidade antioxidante de drogas e muitas vezes geram resultados falsos negativos. Assim torna-se essencial uma melhor elucidação da NMP para este efeito.

Embora tenham existido algumas limitações nesse trabalho, como um melhor esclarecimento do ponto de vista molecular dos mecanismos de ação, de aspectos farmacocinéticos como biodisponibilidade e a real toxicidade da NMP. Este estudo confirma e fornece futuras evidências experimentais para a eficácia terapêutica da NMP em condições inflamatórias e dolorosas. Possivelmente estas ações são devido à diminuição da expressão de mediadores pró-inflamatórios. O efeito antinociceptivo parece ser devido, além da diminuição dos mediadores, à abertura de canais de potássio dependentes de ATP e a um envolvimento com receptores do tipo TRPV1.

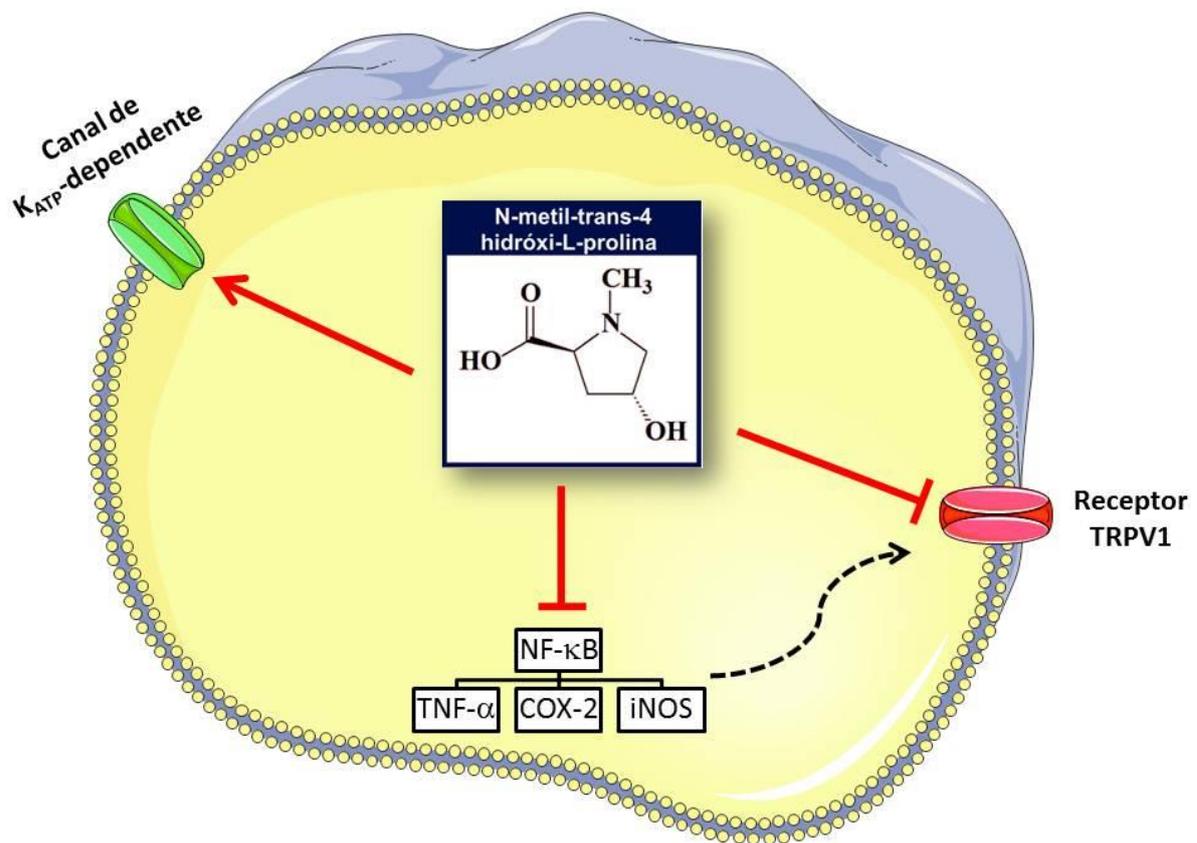
7. CONCLUSÕES

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- A NMP mostrou uma efetiva atividade antiedematogênica observada pela inibição do edema de pata induzido por carragenina em camundongos;
- A atividade antiedematogênica foi corroborada pela diminuição do acúmulo de polimorfonucleares, evidenciado na análise histológica dos tecidos de pata dos animais submetidos ao modelo de edema induzido por carragenina, bem como migração destas para o foco inflamatório no modelo de peritonite induzida por carragenina, e este efeito pode está relacionada ao bloqueio da degranulação de neutrófilos, prevenindo assim a ação da enzima mieloperoxidase;
- Esta ação anti-inflamatória parece estar ligada à diminuição de mediadores inflamatórios, já que a NMP reduziu a marcação de TNF- α , iNOS, COX-2 e NF-kB, como foi avaliado na análise por imunohistoquímica;

- A NMP demonstrou pronunciada atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e Von Frey, inibindo a hiperalgesia;
- O mecanismo de ação antinociceptivo pode estar relacionado ao envolvimento de receptores TRPV1 e na abertura de canais de potássio dependentes de ATP, além da diminuição dos mediadores inflamatórios.

Figura 31: Figura esquemática dos possíveis mecanismos de ação da NMP



O esquema hipotético ilustra os possíveis alvos envolvidos na ação anti-inflamatória e antinociceptiva da NMP, discutidos até o momento.

8. REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; BASÍLIO, I.J.; NURIT, K.; BARBOSA, D.A. Sinopse da flora medicinal do cariri paraibano. **Oecologia Brasiliensis**. Rio de Janeiro ,v.4, n. 3, p.323-330, 2007.
- AKTAN, F. iNOS- mediate nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**. v.6,n.6,p. 639-653, 2004.
- ALCAMO, E.; HACOHEN, N.; SCHULTE, L.C.; RENNERT, P.D.; HYNES, R.O.; BALTIMORE, D. Requirement for the NF- κ B family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. **Journal of Experimental Medicine** v.195, n.2, p.233–244.2002.
- ALESSANDRI, A.L; SOUSA L.P; LUCAS, C.D; ROSSI, A.G; PINHO, V; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacol Therapeut** v.139,n.2, p.189-212.2013.
- ALMEIDA, T. P.; MAIA, J. Z.; FISCHER, C. D. B.; PINTO, V. M.; PULZ, R. S.; RODRIGUES, P. R. C. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 2, p. 107- 118, 2006.
- ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco. **Sapotaceae Rodriguésia**. Pernambuco, v.1,n.2,p. 303-318. 2010.
- ANDRADE, P.M.M; CARMO, M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanoides, inflamação e imunidade. **Instituto de Nutrição Josué de Castro - UFRJ**, v.8.n.3.p.135-143. 2006.
- AQUINO,P.E.A; FIGUEREDO,F.G; PEREIRA, N.L;NASCIMENTO,E. M; MARTIN, A.L.S, VERAS,H.N; OLIVEIRA,C.D.M; FERREIRA,S.S; LEANDRO,L.M.G; SILVA,M.R; MENEZES, I.A.R. Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. **Acta biologica Colombiana**.v. 21,n.1,p.131-140, 2016.
- ARAÚJO-NETO, V.; BOMFIM, R. R.; OLIVEIRA, V. O. B.; PASSOS, A. M. P. R.; OLIVEIRA, J. P. R.; LIMA, C. A; MENDES, S. S.; ESTEVAM, C. S.; THOMAZZI, S. M., Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) T.D. Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasil,v.20, n.6. 2010
- ARMOIRY X, AULAGNER G, FACON T. Lenalidomide in the treatment of multiple myeloma: a review. **The Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v.33, p.219-226.2008.
- BATISTUZZO, J.A.O., ITAYA, M., ETO, Y. **Formulário Medico Farmacêutico**. 3ed, São Paulo: Pharmabooks, 2006.

- BALDWIN, A.S Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. **Journal of Clinical Investigation**. v.107,n.1,p.3-6.2001.
- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.
- BESSON, J. The neurobiology of pain. **The Lancet**. v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.
- BEIRITH, A; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**. v.11,n.924(2),p.219-28.2002.
- BELTRÃO, A.E.S.; TOMAZ, A.C.A.; BELTRÃO, F.A.S.; MARINHO, P. In vitro biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasil, v.18, p. 696-698. 2008..
- BIANCHI M, SACERDOTE P, PANERAI AE. Fluoxetine reduces inflammatory edema in the rat: involvement of the pituitary–adrenal axis. **Eur J Pharmacol** v.263,p.81–84.1994
- BOOTHE, D. M. Anti-inflammatory drugs. **Ciência Animal** v.15,n.1,p.33-41, 2005
- BAUER, H.W; KLASSER, M; HANSTEIN, K.L; ROLINGER, H; SCHLADITZ,G; HENKE, H.D; GIMBEL, W; STEINBACH, K. . Oxaceprol is as effective as diclofenac in the therapy of osteoarthritis of the knee and hip. **Clinical Rheumatology** v. 18,p.4-9.1999.
- BHANDARI, P.; BATEMAN, A. C.; MEHTA, R. L.; PATEL, P. Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is increased with worsening damage to the gastric mucosa. **Histopathology**, v. 46, p. 280-286, 2005.
- CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9169, p. 2051-2058, 1999.
- CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, p.448-464, 2004.
- CAVAZANA, W. C. et al. Comparative study of tissue reactivity to n-butyl-2-cyanoacrylate and nylon monofilament thread on pericranium-cutaneous flaps in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, p.263, 2014.
- CHEN, X; LEVINE, J.D. NOS Inhibitor Antagonism of PG2-Induced mechanical sensitization of cutaneous C Fiber Nociceptors in the rat. **Journal Neurophysiology** v. 81,p. 963- 966.1999.
- COUTO, V.M.; VILELA, F.C; DIAS, D.F.; SANTOS, M.H.; SONCINI, R. NASCIMENTO, C.G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v.134,n.2,p. 348 – 353, 2011.

CRIADO, P.R.; CRIADO, R.F.; MARUTA, C.W.; MACHADO –FILHO, C.D.; Histamine, histamine receptors and antihistamines: new concepts. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.85.n.2.p.195-210.2010.

CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.50, n. 4,p.434-61.2010.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 3, p. 660–664, 1992.

CUNHA, T. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.

DAMAS, J.; BOURDON, V.; REMACLE-VOLON, G.; ADAM, A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.101, p.418-422, 1990.

DE GAULEJAC, S. C.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 425–431, 1999

DE SMET, P.A. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs** v.54,p. 801–840.1997.

DELFINO, L.; MASCIADRI, S.; FIGUEREDO, E. Registro de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn. (Sapotaceae) en bosques psamófilos de la costa atlántica de Rocha, Uruguay. **Iheringia: Série botânica**. v. 2, p.129-133. 2005.

DINARELLO CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**. v.87,p.2095-2147.1996.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A.; GIROUD, J.P. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v.104, n.1, p.15-29, 1971

DUSSE, L.M.S.A.; VIEIRA,L.M.; CARVALHO, M.G. Nitric oxide revision. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. v. 39, n.4. 2003.

EL-HASHEMITE, N.; ZHANG, H.; WALTER, V.; HOFFMEISTER, K.M.; KWIATKOWSKI, D.J. Perturbed IFN--JAK-STAT signal transducers and activators of transcription signaling in tuberous sclerosis mouse models. **Cancer Research**., v. 64, n. 10, p. 3361-3375, 2004.

ERSHLER, W.B; KELLER, E.T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annual Review Medicine**. v.51,p.245-70.2000

FLAUMENHAFT, R. Molecular basis of platelet granule secretion. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 23, n.7, p. 1152-60. 2003.

FELIPPI, M.; GROSSI, F.; NOGUEIRA, A.C.; KUNIYOSHI, Y.S. Morfologia da flor, do fruto e da plântula; ontogênese e germinação de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichl.). **Florestas**. Brasil, v.38, n.2,p. 229-243. 2008.

FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor**. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line. p.106. 2011.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. **Central nervous system mechanisms of pain modulation**. In Text book of pain. Patrick Wall e Ronald Melzack., 4ª ed., Churchill Livingstone, Nova York, 1999

FIGUEREDO, F. G., Ferreira, E. O.; LUCENA, B. F. F.; TORRES, C. M. G.; LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E.C.P.; SILVA, J. M. FL.; SANTOS, F. A. V.; MEDEIROS, C. R.; OLIVEIRA, G. M. M.; COLARES, A.V.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; SILVA. J. C. F.; KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R. L.; MATIAS, E. F. F.. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research Internationa**.v. 1, n. 1-5.2013.

FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v. 9, n.408,p.239-47.2000.

FRANCO, D.G. Fator de Transcrição Nuclear Kappa B no Sistema Nervoso Central: do fisiológico ao patológico. **Revista da biologia**. v. 4,p.35-39. 2010.

FUGEN A. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences** v.75 p.639–653.2004.

FOGLIO, Mary Ann; QUEIROGA, Carmen Lucia; SOUSA, Ilza Maria de Oliveira; RODRIGUES, Rodney Alexandre Ferreira. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multi Ciência: construindo a historia dos produtos naturais**. Brasil, v.7, n. 1. 2006.

GAMA, L.U.; BARBOSA, A.A.; OLIVEIRA, P.E. Sistema sexual e biologia floral de *Pouteriarami flora* e *P. torta* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. Uberlândia, v. 34, n. 3. 2011.

GUEMEI AA, EL DIN NM, BARAKA AM, EL SAID DARWISH I. Do desipramine [10,11-dihydro-5-[3-(methylamino) propyl]-5H-dibenz[b,f]azepine monohydrochloride] and fluoxetine [N-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]-propan-1-amine] ameliorate the extent of colonic damage induced by acetic acid in rats? **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics** v.327,n.3,p. 846-50. 2008

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA,J.M. As quimiocinas e os seus receptores. **Acta Medica Portuguesa**.v.24,n.4,p.967-976.2011.

GUTSTEIN, H.B. et al. Mu and Kappa receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **Neuroreport**, v.9, n.8, p.1777-81. 1998.

- HAYDEN, M. S. et al. NF-kappaB and the immune response. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6758-80, 2006.
- HAN, Z.; BOYLE, D. L.; MANNING, A. M.; FIRESTEIN, G. S. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. **Autoimmunity**, v. 28, p.197–208.1998
- HELLEBREKERS, L. J. **Dor em Animais**. São Paulo: Manole, 2002. p. 69-79
- HERRMANN, G; STEEGER, D; KLASSER, M; WIRBITZKY, J; FURST, M; VENBROCKS, R; ROHDE, H; JUNGMICHEL, D; HILDEBRANDT, H.D; PARNHAM, M.J; GIMBEL, W; DIRSCHEDL, H. Oxaceprol is a well-tolerated therapy for osteoarthritis with efficacy equivalent to diclofenac. **Clinical Rheumatology** v.19,p.99-104.2000.
- HENSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature immunology**, v. 6, n. 12, p. 1179-1181, 2005.
- HENSON, P. M. The immunology release of constituents from neutrophils leukocytes. **The Journal of Immunology**. v. 107, p. 1535, 1971.
- HILARIO, M.O.E; TERRERI,M.T; LEN, C.A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Journal of Pediatrics**. v.82 n.5. 2006.
- HOWARTH, P. H. Histamine and asthma: an appraisal based on specific H1-receptor antagonism. **Clin. Exp. Allergy**, v. 20, p. 31-41, 1990.
- HSU, S.M; RAINE, L; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal Histochemistry Cytochemistry** v.29,p.577-80.
- HUANG, J. F.; THURMOND, R. L. The new biology of histamine receptors. **Curr. Allergy Asthma Rep.**, v. 8, p. 21-27, 2008.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103–114, 1987
- IADAROLA, M. J.; CAUDLE, R. M. Good pain, bad pain. **Science**, v. 278, n. 5336, p. 239-240, 1997.
- IUCN - The World Conservation Union. 2008. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acesso em 02 maio 2016.
- JACQUES D; VICTOR B; GABY R.V; ALBERT A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenan and zymosan in rats. **British Journal Pharmacology**.v.101, p.418-422.1990.
- JOHNSON, L. R. **Fundamentos de fisiologia médica**. P. Guanabara Koogan, 2ª Ed. p. 575-579. 2000.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p.203-210, Sep. 2001.

KALTSCHMIDT, B., WIDERA, D. E KALTSCHMIDT, C. Signaling via NF- κ B in the nervous system. **Biochemica et Biophysica Acta** v.1745,p. 287–299.2005.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T.. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008

KRUGER, K; KLASSER, M; MOSSINGER, J; BECKER, U. Oxaceprol- a randomized, placebocontrolled clinical study in osteoarthritis with a non-conventional non-steroidal anti-inflammatory drug. **Clinical and Experimental Rheumatology** v. 25,p.29-34.2007.

KONIG D, BERG AC, WEINSTOCK C, KEUL J, NORTHOFF H. Essential Fatty Acids, Immune Function and Exercise. **Exerc Immunol** v. 3,p.1-31.1997.

KOPP E, GHOSH S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. v..265,p.956-959.1994.

KOLACZKOWSKA, E; KUBES,P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 13, p. 159-175, 2013.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**. v.18, p.412-416, 1959.

KUBERA,M; CYRUL, W; BASTA-KAIM, A; BUDZISZEWSKA, B; LES KIEWICZ, M; HOLAN, V. Effect of repeated desipramine and fluoxetine administration on post-adjuvant arthritis. **Polish Journal Pharmacology**. v. 52,n.3,p. 229-35.2000.

KELLER, E.; DAVIS,J.L; TACHIKI,K.H.; CUMMINS, J.T.; Joseph T. BAXTER,C.F. L-Proline Inhibition of Glutamate Release. **Journal of Neurochemistry** v.37,n.5,p.1335- 1337. 1981.

KUMAR, V; PERKINS, J. A. **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUMAR, V;ABBAS,A.K; ASTER,J.C. **Robbins e Cotran Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KUMAR, A.P.;PIEDRAFITA, F.J.; REYNOLDS, W.F. Peroxisome proliferatoractivated receptor gamma ligands regulate myeloperoxidase expression in macrophages by an estrogen-dependent mechanism involving the 2463GA promoter polymorphism. **J Biol Chem** v.279,p.8300–8315.2004.

LAPA, A. J. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais, 2003.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

LEANDRO, L.M.G.; AQUINO, P.E.A.; MACEDO, R.O.; RODRIGUES, F.F.G.; GUEDES, T.T.A.M.; FRUTUOSO, A.D.; COUTINHO, H.D.M.; BRAGA, J.M.A.; RIBEIRO, T.R.G. MATIAS. Avaliação da atividade antibacteriana e modulatório de extratos metanólico e hexânico da casca de *Sideroxylon obtusifolium*. **e-ciência**. v.1, n.1, 2013.

LEVINE JD, TAIWO Y - **Inflammatory Pain**, 3ed., Edinburgh, Scotland, Churchill Livingstone, p.45-56.1994

LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal Veterinary of Pharmacology and Therapeutics**, v.27, p.479-490, 2004.

LEITE, N.S.; LIMA, A.P.; ARAÚJO-NETO, V.; ESTEVAM, C.S.; PANTALEÃO, S.M.; CAMARGO, E.A.; FERNANDES, R.P.M.; COSTA, S.K.P.; MUSCARÁ, M.N.; THOMAZZI, S.M. Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.17, n.1, p.164-170, 2015.

LEGRANDA,C.P.; EDELMANNB, J.L.; PUTAUXC, D.; CARTALADEA, P.; SARNI-MANCHADO, A.; VERNHETA, A. Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. **Food Hydrocolloids** v. 20 , p. 687–697.2006.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LOEWENSTEIN WR - Mechano-Electric Transduction in the Pacinian Corpuscle: Initiation of Sensory Impulses in Mechanoreceptors: Autrum H - Handbook of Sensory Physiology. **Berlin. Springer-Verlag**, p.267-290.1971

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais do Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorfonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **The Journal of Immunology**. v. 132, p. 2015-2020, 1984.

LUNA, S. P. L. **Dor, analgesia e bem estar animal**. ANAIS - I Congresso Internacional de Conceitos em Bem-estar Animal, p. 16-18, 2006.

MACHADO, J. G. S. et al. Análise bioética da legislação brasileira aplicável ao uso de animais não-humanos em experimentos científicos. **Revista de Saúde do Distrito Federal, Brasília**, v. 15, n. 3/4, p. 9-21, 2004.

MARMITT, D. J. et al. Plantas Mediciniais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. **Revista Fitos**, v. 9, n. 2, p. 129–144, 2015.

- MALEK, R., BOROWICZ, K.K., JARGIELO, M. E CZUCZWAR, S.J. Role of nuclear factor kB in the central nervous system. **Pharmacological Reports** v.59, p.25-33.2007.
- MARTINS, M.A; DE CASTRO B. L.; TONUSSI, C.R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **Journal of Pain**. v.7,n.2,p. 100 – 107, 2006.
- MARQUES, J. B. **Comércio e conservação de três espécies vegetais da Caatinga ameaçadas de extinção e de uso medicinal em duas áreas do Cariri oriental Paraibano**. João Pessoa, 2008. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Programa Regional de Pós-Graduação em desenvolvimento e Meio AMBIENTE- Universidade Federal da Paraíba / Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa-PB, 2008. Disponível em <http://www.prgp.ufpb.br/prodema/novosite/smartgc/uploads/arquivos/janine_barreto.pdf> Acesso em 02 de maio de 2016>.
- MASHKOVSKII,L.; VINOGRAD,K.; YUZHAKOV,O.V.; DOLGUN,N.A.; FILATOVA,E.A.; TRIBUNSKAYA,N. 1-[4-(2-Hydroxy-3-Tert-Butylaminopropoxy) Indol-3- Yl(5-Acetamido-I-{S}-Carboxypentyl)-DI-Alanyl]-Lproline Dihydrochloride: A new inhibitor of Angiotensin-Converting enzymes with B-Adrenoblocking Properties. **Pharmaceutical Chemistry Journal** v.27, n. 10, 1993.
- MASON L - Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic Pain. **British Journal of Medicine**, v.74.n.46.p.328-991.2004.
- MELZACK, R., WALL, P.D. **Pain mechanisms: a new theory**. Science, 1965. v.150, p.971-979.
- MÉNEZ,BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., SCHERRER, G., JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**. v. 139, p. 267-284. 2009.
- MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Capítulo 8: As dores, em **Neurociência da mente e comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.183-200.
- MONCADA, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, v.43, n.2,p. : 109-42, 1991.
- MONCADA, S., HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v.329,p.2002–2012.1993.
- MONTEIRO, M. H. D. A; NEVES, L.J & ANDREATA, R. H. P. Levantamento e distribuição das espécies de *Pouteria Aubl.* (Sapotaceae) do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Brasil, v.5, n.2, p.369-371. 2007.
- MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.
- MORAIS, F.V; MOLINA,H.M; BORGES,D.R; KOUYOUMDJIAN, M. Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado *ex-vivo*. **Revista da Associação Médica brasileira**. v. 45,n. 1. 1999.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, p.6523–6543.2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63,1983.

NAKAMUF T , TERAMOTO H , TOMITA Y , ICHIHARA A. L-proline is an essential amino acid for hepatocyte growth in culture. **Biochemical and Biophysical Research Communications** , v.122,n.3,p.884-891. 1984.

NATESH, R; SCHWAGER, S.L; EVANS, H.R; STURROCK, E.D; ACHARYA, K.R. Structural Details on the Binding of Antihypertensive Drugs Captopril and Enalaprilat to Human Testicular Angiotensin I-Converting Enzyme. **Biochemistry**.v 43,p. 8718-8724.2004.

NUNES, I.C.C. New antihistamines: a critical review. **Jornal de pediatria**. v.82, n.5, p. 73-80, 2006.

OLIVEIRA, S.H.; CANETTI, C.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration induced by IL-1beta depends upon LTB(4) released by macrophages and upon TNFalpha and IL-1beta released by mast cells. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 36-46, 2008

OLIVEIRA,C.M.B; SAKATA,R.K ; ISSY,A.M; GEROLA , L.R.; SALOMÃO,R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia** v. 61, n. 2. 2011.

OCANA, M., CENDAN, C.M., COBOS, E.J., ENTRENA, J.M., BAEYENS, J.M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European Journal of Pharmacology** v. 500, p. 203-219, 2004.

PALAZZO, F. M. A.; DIAS-NETO, A. O. ; MONTEIRO, M. H. D. A. ; ANDREATA, R. H. P. Sinopse comentada de Sapotaceae no município de Rio das Ostras (RJ, Brasil). **PesquisaBotânica**. São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, v. 61, p.293-306. 2010.

PARK, H. J.; KIM, I. T.; WON, J. H.; JEONG, S. H.; PARK, E. Y.; NAM, J. H.; CHOI, J.; LEE, K. T. Anti-inflammatory activities of ent-16 α H, 17-hydroxy-kauran-19-oic acid isolated from the roots of *Siegesbeckia pubescens* are due to the inhibition of iNOS and COX- 2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF-kB inactivation. **European Journal of Pharmacology**. v. 558, p. 185–193, 2007.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1, p. 296-301, 2008.

PEDROSA, K. M. GOMES, D. S.; LUCENA, C. M.; PEREIRA, D. D. ; SILVINO, G.S.; LUCENA, R. F. P. Uso e disponibilidade local de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. PENN. (Quixabeira) em três regiões da depressão sertaneja da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Biofar**, v.12, p. 158-183.2012.

PEREIRA DS, MORAIS JP, SANTANA DG, SANTOS CA, THOMAZZI SM, SANTOS CE, ANTONIOLLI AR, BEZERRA DP, CAMARGO EA. Effects of the ethanol extract of the inner bark of *Sideroxylon obtusifolium* in the cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 7,p. 1411-1417.2013.

PEREIRA, D.S.; MORAIS, J.P.; SANTANA, D.G; SANTOS, C.A; THOMAZZI, S.M.; SANTOS, C.E.; ANTONIOLLI, A.R.; BEZERRA, D.P.; CAMARGO, E.A. Effects of the ethanol extract of the inner bark of *Sideroxylon obtusifolium* in the cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**. v.7,p. 1411-1417.2013.

PINHEIRO, B;SILVA, A; SOUZA, G; FIGUEIREDO, J; CUNHA, F; LAHLOU, S; DA SILVA ,J.K; MAIA, J.G; SOUSA, P.J; Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**.v. 188,p.479–486, 2011.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: **Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais**. OTERO, P. E. São Paulo:Interbook, p. 30-74. 2005.

PONCET-LEGRANDA, C.; EDELMANNB A .; PUTAUXC,J.L.; CARTALADEA D.P.; SARNI-MANCHADO, A , VERNHETA,A . Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. **Food Hydrocolloids** v.20 p.687–697.2006.

PREMKUMAR, L. S. ABOOJ, M. TRP channels and analgesia, **Life Sciences**. v. 92, p. 415–424. 2013.

QIU, X. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4,7,10,13,16,19): two distinct pathways. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 68,n.2,p.181-6.2003.

RAIBLE, D. G., E. S. SCHULMAN, J. DIMUZIO, R. CARDILLO, T. J.. Mast cell mediators prostaglandin-D2 and histamine activate human eosinophils. **Journal Immunology**. p.148:3536.1992.

RANDOLPH, B.C.; PETERS, M.A. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. **Anesthesia Progress**.v. 44,n.1,p. 11 – 16, 1997.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., **Fármacos analgésicos**. In: RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., Farmacologia. Editora Guanabara Koogan, rio de janeiro, 7a Ed, 2012. p. 485-505.

ROCHA, APC.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA,L.; CARVALHO,L.R.; BARROS,G.A.M.; GARCIA,J.B.S.; SAKATA, R.K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia** v.57,n. 1,p. 94-105.2007.

RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p.869-873, 2002.

ROSSI D, ZLOTNIK A: The biology of chemokines and their receptors. **Annual Review Immunology** v.18,p.217-42.2000.

ROTHWARF, D. M.; KARIN, M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 1999, n. 5, p. RE1, 1999.

ROUMESTAN C, MICHEL A, BICHON F, PORTET K, DETOC M, HENRIQUET C. Antiinflammatory properties of desipramine and fluoxetine. **Respiratory Research**. v. 8,n.35.2007

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. **Chronic pain**. Ann. Rev. Med., 1998. v. 49, p. 123-133

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/ cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K+ channel pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.101, n.10, p.3680-3685, 2004.

SACRE S, MEDGHALCHI M, GREGORY B, BRENNAN F, WILLIAMS R. Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors. **Arthritis e Rheumatology**. v.62,n.3,p.683-93.2010.

SALLUSTO F, MACKAY C, LANZAVECCHIA A: The Role of Chemokine Receptors in Primary, Effector, and Memory Immune Responses. **Annual Review Immunology** v. 18,p.593-620.2000.

SALVEMINI D, WANG ZQ, WYATT PS, BOURDON DM, MARINO MH, MANNING PT, CURRIE MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced paw inflammation. **British Journal Pharmacology** v. 118,p. 829-838.1995.

SALVEMINI, D, MISKO TP, MASFERRER JL, SEIBERT K, CURRIE MG, NEEDLEMAN P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 90,p.7240-7244.1993

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**., v. 31, n. 4, p. 381-389. 1997.

SANTOS, E.B. DANTAS, G.S.; SANTOS, H.B.; DINIZI, M.F.F.M.; SAMPAIO, F.C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, n. 1B, p.321-324. 2009.

SARHAN; SEILER. Proline and proline derivatives as anticonvulsants. **General Pharmacology**. v. 20, n.1, p. 53-60. 1989

SCHAFFER FQ, BUETTNER GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**. v.1,n.30(11),p.1191-212.2001.

SCHRODER, N.W., OPITZ, B., LAMPING, N., MICHELSEN, K.S., ZHRINGER, U., GOBEL, U.B., SCHUMANN, R.R. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by Treponema glycolipids. **Journal of Immunology** v.165, n.5,p. 2683 – 2693.2000.

SERHAN, C. N. "Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution." **Prostaglandins Leukocits Essential Fatty Acids** v. 73,n.3-4,p. 141-162.2005.

SHEN, Y; HALPERIN, J.A; BENZAQUEN, L; LEE,C.M. Characterization of neuronal cell death induced by complement activation. **Brain Research Protocol** v.1,p.186-94.1997.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASKI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1989.

SIKANDER, A.; RANA, S. V.; PRASAD, K. K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. **Clinica chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v.403,p.47-55.2009.

SILVEIRA,D.M.; FRANCO,F.C.M.; NASCIMENTO,I.L.;SALOMÃO, M.F.L.; ARAÚJO,T.M.Pesquisa de Interferon Gama em tecido periodontal de ratos submetidos à movimentação dentária induzida. **Rev. Dent. Press Ortodon**. v.14 n.2. 2009

SILVA, J.C.; SARAIVA, S.R.G.L. OLIVEIRA-JUNIOR,R.G.;ALMEIDA,J,R,G,S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacia**. v.94,n.1,p. 18-23, 2013.

SILVA, M.D. **Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Medicinais da Caatinga em Pernambuco**. Recife, 2008. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Botânica - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008. Disponível em: <http://www.pgb.ufrpe.br/doctos/2008/dissertacoes/estudo_farmacobotanico_milena_dutra.pdf>. Acesso em: 11 Julho, 2016.

SOLDEVILA G, GARCÍA-ZEPEDA EA: The role of the Jak-Stat pathway in chemokine-mediated signaling in T lymphocytes. **Signal Transduct** v.7,p.427-38.2007.

SRIVASTAVA, S.K.; RAMANA, K.V. Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. **Exp. Eye. Res.**, v. 88, p. 2-3, 2009.

SUNG, S.; HENGXUAN, Y.; KUNIHIRO, U.; LEE, E.B.; ZHAO, L.; SHINEMAN, D.; TROJANOWSKI,J.Q.; LEE.V.M;Y PATRICO, D. Modulation of Nuclear Factor-B Activity

by Indomethacin Influences A Levels but Not A Precursor Protein Metabolism in a Model of Alzheimer's Disease. **American Journal of Pathology**.v. 165,n. 6. 2004.

SZABADOS L, SAVOURÉ A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends Plant Science**. v.15,n.2,p.89-97.2010.

TAKADA Y, BHARDWAJ A, POTDAR P, AGGARWAL BB. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappa B activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. **Oncogene**. v.23,p.9247-9258.2004.

TEIXEIRA, M.J. **A lesão do trato de Lissauer e do corno posterior da substância cinzenta da medula espinal e a estimulação elétrica do sistema nervoso central para o tratamento da dor por desafferentação**. São Paulo, 1990. Tese (Doutorado), São Paulo Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 256 p.

TORIYABE M, OMOTE K, KAWAMATA T, NAMIKI A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. **Anesthesiology** v.101,p.983-990.2004

TRINCHIERI G. Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigenspecific adaptive immunity. **Annual Review Immunology**. v.13,p.251-76.1995.

THELEN, M; DEWALD, B; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. **Physiol Rev**. v.73,n.4,p.797-821.1993

VASCONCELOS,S.M.L.; GOULART,M.O.F.; FRANÇA,J.B.; MANFREDINI.V . BENFATO,M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo. **Quimica Nova**, v.30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

VEIHELMANN, A; HOFBAUER, A; REFIOR, H.J; MESSMER, K. Oxaceprol, na atypical inhibitor of inflammation, reduces leukocyte adherence in mouse antigen-induced arthritis. **Acta Orthopaedica Scandinavica** v.72,p.93-298.2001.

VELO, G.P.; WILLOUGHBY, D.A. ; GIROUD G.P. **Future trends in Inflammation. Proceedings of an International Meeting on Inflammation**; Verona, 1973.

VERRI-JUNIOR,W.Q.; SILVA,J.S.; POOLE, S.;CUNHA,F.Q.; FERREIRA, S.H.; CUNHA T. M. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice.**Proceedings of the Nacional Academy os Sciences os United States of America**. v.1032,n.5, p. 1755-1760.2005.

VITAGLIANO,L.; BERISIO,R.; MAZZARELLA, L.; ZAGARIA,Structural Bases of Collagen Stabilization Induced by Proline Hydroxylation. **Biopolymers** v. 36. 2001.

VITOR, A.O.; PONTE, E.L.; SOARES, P.M.; LIMA, R.C.S.; VASCONCELOS, S.M.M. **Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica**. RECIIS, 2008. v.2, n.1, p.87-96.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The top 10 causes of death. The 10 leading causes of death in the world 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>> Acesso em: 9 de julho. 2015.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 52, n. 3, p. 349-374, 2000.
- WAISBROD, H. et al. Chronic pain in paraplegics. **Neurosurgery**, v.15, p.993-994, 1984.
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.
- WOLF G, LIVSHITS D, BEILIN B, YIRMIYA R, SHAVIT Y. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain Behav Immun** v.22,p.1072-1077.2008.
- WONG, E. T.; TERGAONKAR, V. Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. **Clinical Science (Lond)**, v. 116, n. 6, p. 451-65, 2009.
- XIAO, W. Advances in NF-κB signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology**. v.1, n.6,p. 425–433.2004.
- YARON I, SHIRAZI I, JUDOVICH R, LEVARTOVSKY D, CASPI D, YARON M. Fluoxetine and amitriptyline inhibit nitric oxide, prostaglandin E2, and hyaluronic acid production in human synovial cells and synovial tissue cultures. **Arthritis Rheum**. v.42,n.12,p. 2561- 8.1999.
- YAMAMOTO, G.R; PORTINHO,C.P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Rev Ass Med Brasil** v. 47,n.1,p.41-51.2001.
- YIN M, YAMAMOTO Y, GAYNOR R. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. **Nature**. v.396:77,p.80.1998.
- YOU DIM KA, MARTIN A, JOSEPH JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **Int J Dev Neurosci**. v. 18,n.4/5,p.383-99. 2000
- ZHANG, JM; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin** v.45,p.27-37.2007.
- ZIDI, I.; MESTIRI, S.; BARTEGI, A.; AMOR, N.B. TNF-α and its inhibitors in cancer. **Med Oncol**, v. 27, p. 185-198, 2010.