

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

GISLEI FROTA ARAGÃO

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA,
ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E EFEITOS CENTRAIS
DE
ALFA E BETA AMIRINA ISOLADA DE
Protium heptaphyllum Aubl March.**

**Fortaleza
2004**

GISLEI FROTA ARAGÃO

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA,
ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E EFEITOS CENTRAIS DE
ALFA E BETA AMIRINA ISOLADA DE
Protium heptaphyllum Aubl March**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glauce Socorro de Barros Viana

**Fortaleza
2004**

- 671a Aragão, Gislei Frota
Atividade antiinflamatória, antiagregante plaquetária e efeitos centrais de alfa e beta amirina isolada de *Protium heptaphyllum Aubl March* / Gislei Frota Aragão. – Fortaleza, 2004.
185f. : il.
Orientador(a): Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-graduação em Farmacologia.
1. Farmacologia. 2. Amirina. I. Título

CDD 615.1

GISLEI FROTA ARAGÃO

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA,
ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E EFEITOS CENTRAIS DE
ALFA E BETA AMIRINA ISOLADA DE
Protium heptaphyllum Aubl March**

Dissertação submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

Data da Defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^ª. Dra. Marta Maria de França Fonteles
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus:

Pela vida e por este momento.

À minha família:

Pelo apoio incondicional.

Ao meu filho:

Pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

** À Profa. Glauce Socorro de Barros Viana pela atenção, dedicação, competência, qualidades humanas e pela confiança em mim depositada ao aceitar-me como orientando na realização deste trabalho.*

** Aos Profs. do curso de pós-graduação em Farmacologia, que de maneira direta ou indireta fizeram parte deste trabalho.*

** À Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos e ao Prof. Dr. Paulo Nogueira Bandeira que nos forneceram o material para estudo, bem como por toda cooperação prestada e amizade.*

** À Lyvia Maria Vasconcelos Carneiro pela grande e valiosa cooperação, onde também me motivou bastante para a conclusão deste trabalho.*

** À colega Marta Cristhianny Cunha Pinheiro pela grande colaboração no início dos trabalhos.*

** À Danielle Silveira Macedo por sempre estar disposta a ajudar, auxiliando muito neste trabalho.*

** Aos amigos da pós-graduação, em especial Cícero, Iri Sandro, Lissiana, Silvânia, Kalyne, Emmanuelle, Patrícia, Aline e Juvênia pela amizade, ajuda mútua e alegre convivência no período do curso.*

** À Vilani Rodrigues Bastos e Jaqueline pela amizade e imprescindível auxílio técnico.*

** Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, com os quais tive ótimo convívio e pude contar com suas colaborações.*

** A MEAC/UFC pelo apoio e incentivo profissional.*

** Ao CNPq pela concessão dos recursos financeiros*

“Quem dentre vós é sábio e entendido?

Mostre pelo seu bom procedimento as suas obras em mansidão e sabedoria”

(Tiago 3 : 13)

*“O Senhor é bom e seu amor dura para sempre e sua fidelidade dura de
geração em geração”*

(Salmo 100 : 5)

RESUMO

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA, ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E EFEITOS CENTRAIS DE ALFA E BETA AMIRINA OBTIDO DE *Protium heptaphyllum* Aubl March

A espécie *Protium heptaphyllum* Aubl. March. pertencente a família Burseraceae, é comum em várias regiões do Brasil, onde é conhecida como almecega ou breu branco. É muito utilizada popularmente como antiinflamatória e antiúlcera. O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos farmacológicos de uma mistura isomérica de dois triterpenos: a alfa e beta amirina (AMI) isolados do *Protium heptaphyllum*. Foram estudadas, em camundongos, as atividades antinociceptiva, antiedematogênica, antiplaquetário e ações em nível de Sistema Nervoso Central (SNC), utilizando vários modelos experimentais. AMI inibiu as contorções abdominais induzidas por ac. acético em 73 e 94% nas doses de 10 e 50 mg/Kg, i.p., respectivamente. No teste da formalina o efeito é observado nas duas fases, com inibições de 37 e 51% na 1ª fase e 60 e 73% na 2ª fase depois da administração de 10 e 50 mg/Kg,i.p., respectivamente. No teste da placa quente a AMI aumenta a latência ao estímulo térmico na dose de 50 mg/Kg, i.p. (62, 71 e 25% de inibição nos tempos 30, 60 e 90 min, respectivamente), o efeito antinociceptivo é principalmente periférico e independe do sistema opióide. Nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e por dextrano em camundongos a AMI demonstrou efeito antiedematogênico, com efeito, dose-dependente, nos dois modelos. O efeito curativo onde a AMI foi administrada após a formação do edema foi avaliado também com os dois agentes edematogênicos citados e a AMI foi mais eficaz para tratar o edema provocado pela carragenina. O efeito antiedematogênico da AMI não foi potencializado na presença de indometacina (droga inibidora de ciclooxigenases), contudo a associação com talidomida, que reconhecidamente inibe a liberação de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α), resultou em efeito sinérgico e, portanto maior do que o efeito de cada uma das drogas isoladamente, indicando que o mecanismo de ação envolve inibições de níveis de TNF α . Efeitos ao nível de Sistema Nervoso Central foram verificados pela AMI do tipo dose-dependente como a diminuição da capacidade exploratória e a frequência de rearing no teste do Campo Aberto e no teste do labirinto em cruz elevado observou-se um efeito ansiolítico com AMI na dose de 50 mg/Kg. O efeito antiagregante plaquetário foi observado em plaquetas humanas, onde a AMI inibiu a agregação frente, aos agonistas testados: ADP (3 μ M), colágeno (10 μ M) e ác. araquidônico (150 μ g/mL). Este efeito foi potencializado pelo AAS (inibidor da ciclooxigenase), frente principalmente, ao agonista ADP (Adenosina Difosfato). Os resultados do trabalho nos permitiram concluir que a AMI possui atividades analgésicas, antiinflamatórias (tanto quando utilizado profilaticamente como também terapeuticamente), sedativas, ansiolítico e antiagregante plaquetária.

ABSTRACT

ANTIINFLAMMATORY, ANTIAGGREGANT ACTIVITY AND CENTRAL EFFECTS OF ALPHA AND BETA AMYRIN FROM *Protium heptaphyllum* Aubl March.

The species *Protium heptaphyllum* Aubl. March. belonging to the family Burseraceae is common in several areas of Brazil, where is known as almecega or white pitch. The plant is used popularly an anti-inflammatory and antiulcer. The objective of the present work was to study the pharmacological effects of a isomeric mixture of two triterpenes: alpha and beta amyirin (AMI) isolated from *Protium heptaphyllum*. The pharmacological activities (antinociceptive, antiedematogenic, central and antiaggregant), of AMI were studied in mice, using several experimental models. AMI inhibited the abdominal contractions induced by acetic acid in 73 and 94% in the doses of 10 and 50 mg/Kg, i.p., respectively, when compared to control. In the formalin test, the effect was observed in the two phases, with inhibitions of 37 and 51 % (1st phase) and 60 and 73% (2nd phase) after the administration of 10 and 50 mg/Kg,i.p., respectively. In the hot plate test, AMI increased the latency to the thermal stimulus in the dose of 50 mg/Kg, i.p., with 62, 71 and 25% inhibitions after 30, 60 and 90 min, respectively). The antinociceptive effect is mainly peripheral and independent of the opioid system. In the models of paw edema induced by carrageenan and dextran in mice, AMI demonstrated a antiedematogenic dose-dependent effect, in the two models. The healing effect of AMI, when administered after the formation of the edema was also evaluated with the two edematogenic agents (carrageenan and dextran), AMI was more effective to treat the edema provoked by the carrageenan. The antiedematogenic effect of AMI was not potentiated in the presence of indometacin (cyclooxygenase inhibitor), however the association with thalidomide, a strong inhibitor of the liberation of TNF- α , resulted in a synergistic effect and therefore larger than the effect of each one of the drugs separately, indicating that the mechanism of action involves inhibition of levels of TNF- α . The central effect of AMI (the decrease of the exploratory activity and the rearing frequency in the Open Field test) were also dose-dependently. In the elevated plus maze test it was observed an anxiolytic effect with AMI in the dose of 50 mg/Kg, i.p. The inhibition of platelet was observed in human platelets, where AMI inhibited the aggregation induced by following agonists: ADP (3mM), collagen (10mM) and arachidonic acid (150mg/mL). This effect was potentiated by acetylsalicylic acid (a cyclooxygenase inhibitor), mainly by the ADP agonist. The results of the work allowed to conclude us that AMI have analgesic, anti-inflammatory (profilatic and therapeutic effects), sedative, anxiolytic activities as well as also an antiaggregation affect of human platelets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografia da espécie <i>Protium heptaphyllum</i> March.....	23
Figura 2: <i>Protium heptaphyllum</i> March. Fotografia ilustrando folhas e frutos.....	25
Figura 3: <i>Protium heptaphyllum</i> . Fotografia ilustrando a obtenção e coleta da resina.....	26
Figura 4: Fórmula estrutural da α e β -amirina.....	28
Figura 5: Figura esquemática da ação de agentes terapêuticos bloqueando o efeito de citocinas.....	33
Figura 6: Alteração morfológica da plaqueta após sua ativação.....	38
Figura 7: Participação de receptores na ativação plaquetária.....	42
Figura 8: Fluxograma da obtenção da α e β -amirina.....	56
Figura 9: Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado e do Campo Aberto.....	67
Figura 10: Efeito da AMI no teste de contorção abdominal com ácido acético.....	76
Figura 11: Efeito da AMI no teste de formalina em camundongos.....	80
Figura 12: Efeito da AMI no teste da placa quente em camundongos.....	83
Figura 13: Efeito da AMI no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	86
Figura 14: Avaliação do efeito sinérgico entre IND e AMI no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	89
Figura 15: Efeito da AMI no edema de pata induzido por dextranso em camundongos.....	92
Figura 16: Reversão pela AMI do edema induzido por carragenina (Efeito Curativo) em camundongos.....	95
Figura 17: Reversão pela AMI do edema induzido por dextranso (Efeito Curativo) em camundongos.....	98
Figura 18: Avaliação do efeito sinérgico entre a Talidomida (TLD) e a AMI no edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	101

Figura 19: Efeito da administração da AMI em camundongos no teste do Campo Aberto.....	105
Figura 20: Efeito da administração da AMI em camundongos no teste do Labirinto em Cruz Elevado (<i>Plus Maze</i>).....	107
Figura 21: Curvas de agregação obtidas com AMI na presença de ADP.....	111
Figura 22: Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas induzida por ADP.....	113
Figura 23: Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas induzida por colágeno.....	116
Figura 24: Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas induzida por ácido araquidônico.....	119
Figura 25: Influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela AMI.....	121
Figura 26: Interferência da AMI na inibição da agregação plaquetária induzida pelo AAS.....	124
Figura 27: Biosíntese de prostanóides a partir de ácido araquidônico	130
Figura 28: Produção de citocinas através da fosforilação do I κ B.....	135
Figura 29: Ativação do NF κ B através da sensibilização de receptores para TNF- α via TRAF2.....	137
Figura 30: Esquema da indução genética das respostas imunes e inflamatórias através da ativação da enzima TRAF6 e conseqüente liberação de NF κ B para o núcleo celular.....	138
Figura 31: Desenho esquemático das reações plaquetárias que ocorrem após o estímulo dos indutores da agregação.....	148
Figura 32: Receptores de ADP em plaquetas humanas.....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito da AMI no teste de contorção abdominal com ácido acético.....	75
Tabela 2: Efeito da AMI no teste de formalina em camundongos.....	79
Tabela 3: Efeito da AMI no teste da placa quente em camundongos.....	82
Tabela 4: Efeito da AMI no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	85
Tabela 5: Avaliação do efeito sinérgico entre IND e AMI no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	88
Tabela 6: Efeito da AMI no edema de pata induzido por dextrano em camundongos.....	91
Tabela 7: Reversão pela AMI do edema induzido por carragenina (Efeito Curativo) em camundongos.....	94
Tabela 8: Reversão pela AMI do edema induzido por dextrano (Efeito Curativo) em camundongos.....	97
Tabela 9: Avaliação do efeito sinérgico entre a Talidomida e a AMI no edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	100
Tabela 10: Efeito da administração da AMI em camundongos no teste de Campo Aberto.....	104
Tabela 11: Efeito da administração da AMI em camundongos no teste do Labirinto em Cruz Elevado (<i>Plus Maze</i>).....	106
Tabela 12: Efeito da administração da AMI em camundongos no teste de Rota Rod.....	109
Tabela 13: Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas induzida por ADP.....	112
Tabela 14: Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas induzida por colágeno.....	115

Tabela 15: Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas induzida por ácido araquidônico (AA).....	118
Tabela 16: Interferência da AMI na inibição da agregação plaquetária induzida pelo AAS frente aos agonistas: ADP, colágeno e AA.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μg - Micrograma.

μL - Microlitro.

μM - Micromolar.

°C - Grau centígrado.

12-HETE - 12-Hidroxiácido eicosatetraenóico.

5-HETE - 5-Hidroxiácido eicosatetraenóico.

5-HT - Serotonina.

5-LOX - 5-Lipoxigenase.

AA - Ácido araquidônico.

AAS - Ácido acetilsalicílico.

ADP - Adenosina Difosfato.

AMI - Mistura isomérica de alfa e beta amirina.

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico.

AP1 - Proteína ativadora 1.

ATP - Adenosina Trifosfato.

CAK - Subunidade catalítica da proteína quinase AMPc-dependente.

Ca²⁺ - Ion cálcio.

cm - Centímetro.

COX-1 - Ciclooxygenase-1.

COX-2 - Ciclooxygenase-2.

DAG - Diacilglicerol.

DNA - Ácido Desoxiribonucléico.

Epi - Epinefrina.

g - Grama.

GPIIb/IIIa - Glicoproteína IIb/IIIa.

h - Hora.

HPETE - Hidroperoxiácido eicosatetraenóico.

i.p. - Intraperitoneal.

IκB - Inibidor de κB.

IL-1 - Interleucina 1.

IL-6 - Interleucina 6.

IL-8 - Interleucina 8.

IP₃ - Inositol 1,4,5-trifosfato.

IRAK - Quinase associada ao receptor de IL-1.

KBr - Brometo de Potássio.

Kda - Kilodalton.

Kg - Kilograma.

LPS - Lipopolissacarídeo.

LTs - Leucotrienos.

M - Molar.

Mg - Miligrama.

MHz - Megahertz.

min - Minuto.

mL - Mililitro.

NF-κB - Fator Nuclear κB.

NIK - Quinase indutora de NFκB.

PAF - Fator de Agregação Plaquetária.

PGD₂ - Prostaglandina D₂.

PGE₂ - Prostaglandina E₂.

PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}.

PGG₂ - Prostaglandina G₂.

PGH₂ - Prostaglandina H₂.

PGI₂ - Prostaglandina I₂.

PKA - Proteína quinase AMPc-dependente.

PKC - Proteína cinase C.

PLA₂ - Fosfolipase A₂.

PPP - Plasma pobre em plaquetas.

PRP - Plasma rico em plaquetas.

RMN - Ressonância Magnética Nuclear.

RNA - Ácido Ribonucléico.

rpm - Revoluções por minuto.

s.c. - Subcutâneo.

SNC - Sistema Nervoso Central.

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa.

TNF-R1 - Receptor para TNF α do tipo 1.

TNF-R2 - Receptor para TNF α do tipo 2.

TRADD - Domínio morto associado ao Receptor do tipo 1 para TNF α .

TRAF2 - Fator 2 associado ao Receptor de TNF α .

TXA₂ - Tromboxano A₂.

TXB₂ - Tromboxano B₂.

UB - Ubiquitina.

UFC - Universidade Federal do Ceará.

v.o. - via oral.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	XIII
1 INTRODUÇÃO	
1.1 Considerações Botânicas.....	21
1.1.1 Família Burseraceae.....	21
1.1.2 <i>Protium heptaphyllum</i>	21
1.1.3 Terpenos e Amirina.....	27
1.2 A Inflamação.....	30
1.3 A Agregação plaquetária.....	35
1.4 Ansiedade e Modelos Experimentais Farmacológicos.....	44
2 OBJETIVOS	
2.1 Geral	48
2.2 Específicos.....	48
3 MATERIAL	
3.1 Planta.....	51
3.2 Animais.....	51
3.3 Sangue Humano.....	51
3.4 Reagentes, soluções e outros.....	52
3.5 Equipamentos.....	53
4 MÉTODOS	
4.1 Obtenção da resina do <i>Protium heptaphyllum</i>	55
4.2 Obtenção da alfa e beta amirina	55
4.3 Preparação da amostra.....	57

4.4 Determinação da atividade antinociceptiva da mistura isomérica de alfa e beta amirina(AMI).....	57
4.4.1 Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	57
4.4.2 Teste da Formalina.....	58
4.4.3 Teste da Placa Quente.....	59
4.5 Determinação da atividade antiedematogênica da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI) em camundongos.....	60
4.5.1 Modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	60
4.5.2 Determinação da potencialização do efeito antiedematogênico da indometacina pela AMI em edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	61
4.5.3 Modelo de edema de pata induzido por dextrano em camundongos.....	61
4.6 Avaliação do efeito terapêutico e curativo administrando a AMI após a formação de um edema.....	62
4.6.1 Na reversão do edema inflamatório induzido pela carragenina.....	62
4.6.2 Na reversão do edema inflamatório induzido pelo dextrano.....	63
4.7 Avaliação do efeito sinérgico entre a talidomida e a AMI no edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	64
4.8 Avaliação de efeitos comportamentais relacionados ao SNC pela AMI em camundongos.....	65
4.8.1 Avaliação da atividade exploratória.....	65
4.8.2 Avaliação da coordenação motora.....	68
4.9 Determinação da atividade inibitória da mistura isomérica de alfa e beta amirina sobre a agregação de plaquetas humanas <i>in vitro</i>	68
4.9.1 Colheita do sangue.....	68
4.9.2 Obtenção do plasma rico em plaquetas.....	69

4.9.3	Teste de agregação plaquetária em PRP.....	69
4.9.4	Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP.....	70
4.9.5	Avaliação da influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela AMI.....	71
4.9.6	Determinação da potencialização pela AMI da ação inibitória do ácido acetilsalicílico sobre a agregação plaquetária.....	71
5 RESULTADOS		
5.1	Determinação da atividade antinociceptiva da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI).....	74
5.1.1	Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	74
5.1.2	Teste da Formalina.....	77
5.1.3	Teste da Placa Quente.....	81
5.2	Determinação da atividade antiedematogênica da mistura isomérica de alfa e beta amirina.....	84
5.2.1	Modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	84
5.2.2	Determinação da potencialização do efeito antiedematogênico da indometacina pela AMI em edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	87
5.2.3	Modelo de edema de pata induzido por dextrano em camundongos.....	90
5.3	Avaliação do efeito terapêutico e curativo administrando a AMI após a formação de um edema.....	93
5.3.1	Na reversão do edema inflamatório induzido pela carragenina.....	93
5.3.2	Na reversão do edema inflamatório induzido pelo dextrano.....	96
5.4	Avaliação do efeito sinérgico entre a talidomida e a AMI no edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	99

5.5 Avaliação de efeitos comportamentais da AMI em camundongos.....	102
5.5.1 Avaliação da atividade exploratória.....	102
5.5.2 Avaliação da coordenação motora.....	108
5.6 Determinação da atividade inibitória da AMI sobre a agregação de plaquetas humanas <i>in vitro</i>	110
5.6.1 Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP em PRP.....	110
5.6.2 Inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno em PRP.....	114
5.6.3 Inibição da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico em PRP.....	117
5.6.4 Avaliação da influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela alfa e beta amirina (AMI).....	120
5.6.5 Determinação da potencialização pela alfa e beta amirina (AMI) da ação inibitória do ácido acetilsalicílico sobre a agregação plaquetária.....	122
6 DISCUSSÃO.....	126
Amirina e o Processo Inflamatório.....	126
Amirina e a Nocicepção.....	142
Amirina e a Agregação Plaquetária.....	145
Amirina e o Sistema Nervoso Central.....	152
7 CONCLUSÕES.....	160
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Botânicas

1.1.1 Família Burseraceae

A família Burseraceae pertencente à ordem Rutales é bastante rica em espécies distribuídas em 16 gêneros sendo encontrada nas regiões tropicais e subtropicais. As mais de 800 espécies conhecidas são bastante dispersas ocorrendo na América do Sul, América do Norte, África Tropical, Ásia Tropical e nas Antilhas (Pernet, 1972).

São árvores de pequeno porte ou arbustos, mas algumas espécies podem atingir o dossel da floresta. A presença de resina aromática é encontrada em quase todas as partes da planta, com cheiro lembrando incenso ou terpenos (breu). Suas folhas são alternas e compostas, geralmente imparipenadas. Os folíolos muitas vezes têm puvínulo (*Protium*). As inflorescências podem ocorrer como racemos, panículas ou pseudo-espigas. As flores são unissexuadas e muito pequenas, de cor creme, amareladas ou esverdeadas, raramente avermelhadas. As flores tem de 3 a 5 sépalas, normalmente unidas, e 3 a 5 pétalas, livres ou unidas. Os frutos são drupáceos, às vezes capsulares, muitas vezes oblíquos. O pirênio está envolto por polpa de cor branca que se destaca devido à cor vistosa das válvulas ou columela ou devido à cor preta do pirênio (Ribeiro e cols., 1999).

A família é subdividida em três tribos, segundo Engler: Protieae, Boswellieae e Canarieae. A tribo protieae por sua vez, está distribuída em três gêneros: *Garuga*, *Tetragastris* e *Protium* (Guimarães, 1997). Este último gênero é o mais representativo, com cerca de 136 espécies (Susunaga, 1995).

1.1.2 *Protium heptaphyllum*

O gênero *Protium* (Burseraceae) é o mais representativo da família com cerca de 136 espécies e dentre estas espécies temos, *Protium heptaphyllum* (*Amyris ambrosiaca*

Willd., *Icica guianensis* T. & Pl, *I. heptaphyllum* Aubl., *I. surinamensis* Miq., *I. Tacahamaca* H.B.K., *P. aromaticum* Engl.).

É uma árvore que proporciona boa sombra e apresenta qualidades ornamentais, podendo, por conseguinte, ser utilizada na arborização urbana e rural (**Figura 1**). Abaixo segue a descrição botânica transcrita textualmente, segundo Corrêa, 1994.

“Árvore grande podendo medir até 20 metros de altura; casca cinzenta, pouco espessa; folhas pinadas, 2-3 jugas ou raras vezes 4-jugas; folíolos oblongos, inteiros, glabros, de 10 centímetros de comprimento e 5 centímetro de largura 9; flores verde-amareladas, pequenas abundantíssimas, dispostas em panículas; fruto drupa vermelha, ovóide, contento polpa resinosa e amarela envolvendo 1 semente, rara vezes mais, até 4 (**Figura 2**). Fornece madeira branco-avermelhada, com cerne mais escuro, compacta, uniforme, ondeada, bastante elástica e acetinadas, dura, revessa, porém dócil ao cepilho e à serra, excelente para construção civil, obras internas, soalho, marcenaria, torno, carpintaria, etc., sendo de grande duração em lugares secos; peso específico 0,771. A casca e as folhas são muito reputadas popularmente contra úlceras gangrenosas e as inflamações em geral. Parece ser esta a espécie do gênero que exsuda maior quantidade de resina, cuja cor é branco-avermelhada”.



Figura 1 - Fotografia da espécie *P.heptaphyllum* March.
Fonte: Bandeira, 2003.

Existe as variedades *puberullum* de pecíolos e nervuras dos folíolos pubescentes, 3 pares de folíolos, panículas maiores e flores completamente brancas; *brasiliensis* (*A. ambrosiaca* Vell., *brasiliensis* Willd., *I. heptaphylla* M.), geralmente de 7 folíolos oblongos-acuminados, flores muito aglomeradas com pétalas maiores e drupas maiores; e *angustifolium* (*I. Salzmanni* Turcz.) de folíolos muito mais estreitos. A espécie tipo ou as variedades encontram-se em todo Brasil, vegetando de preferência em terrenos arenosos. São conhecidas popularmente como: Almecegueira cheirosa, Almecegueira de cheiro, Almecegueira vermelha, almecegueiro bravo, Arouaou, Haiawa e Ubirasiguá de algumas tribos aborígenes; Breu branco verdadeiro, na Amazônia; Icaica-assú, Incenso de caiena, na Guiana Francesa, Curucaí, na Venezuela; Karun-phul, na Índia; Tacahamaca, na Colômbia; Tembetari-hu, na Argentina (Corrêa, 1984).

A espécie *Protium heptaphyllum*, assim como as demais espécies da família Burseraceae são produtoras de resina oleosa conhecida como breu branco, goma limão, etc (**Figura 3**). A resina oleosa é obtida pela lesão do tronco, causada pelo ataque de insetos, secretada de forma espontânea ou pela ação do homem, apresenta-se de consistência variável e não possui composição simples (Costa, 1994). É utilizada na indústria de verniz, tinta, na calafetação de embarcações e em rituais religiosos como incensos (Corrêa, 1984).

Embora sejam muitos os usos terapêuticos atribuídos à espécie *Protium heptaphyllum* na medicina popular, poucos são os estudos os estudos farmacológicos com registros na literatura. Destacando-se a atividade cercaricida dos óleos essenciais das folhas e dos frutos (Frischkorn, 1978). Estudos farmacológicos recentes provam o uso do óleo essencial da resina e das folhas como antiinflamatório, antinociceptivo e antineoplásico (Siani e cols., 1999).



Figura 2 - *P. heptaphyllum* March, fotografia ilustrando folhas e frutos
Fonte: Bandeira, 2003.

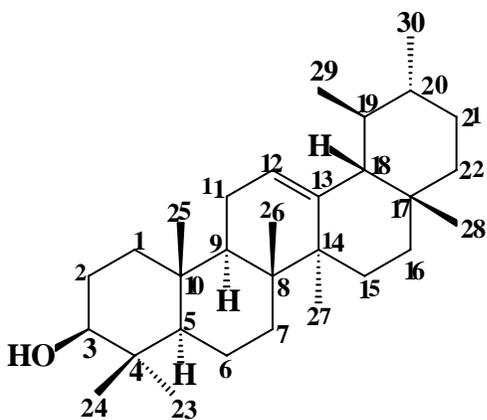
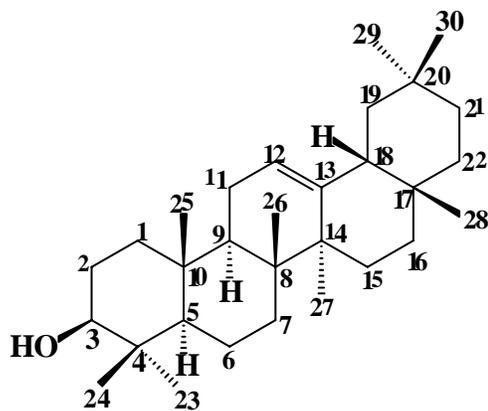


Figura 3 - *P. heptaphyllum*, fotografia ilustrando a obtenção e coleta da resina.
Fonte: Bandeira, 2003.

Os estudos fitoquímicos desta espécie ainda são poucos e aliado ao grande uso na terapêutica popular levaram ao grupo de pesquisa em Química Orgânica da UFC, coordenado pela Professora Dra. Telma Leda Gomes de Lemos a fazer um estudo detalhado desta planta. Deste estudo resultou o isolamento e identificação de oito substâncias, sendo um monoterpene: p-ment-3-eno-1,2,8 triol; três triterpenos: α -amirina e β -amirina como mistura binária e Breina; uma cumarina: escopoletina; dois flavonóides: quercetina e quercetina-3-O-raminosil e uma catequina e também a identificação dos constituintes voláteis dos óleos essenciais da resina, frutos verdes, frutos maduros, folhas e cascas. A análise quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência, da mistura α -amirina e β -amirina presente em quantidade na resina de *Protium heptaphyllum*, observou-se à proporção de 3% destes constituintes (Bandeira, 2003).

1.2 Terpenos e Amirina

Triterpenóides são metabólitos secundários não-esteroidais presente na flora terrestre, marinha e fauna, constituindo-se nos componentes majoritários em algumas plantas usadas na medicina tradicional, com ocorrência na forma livre, bem como na forma de éteres, ésteres e glicosídeos. Como o nome deixa entender, triterpenóides são isopentenóides compostos de 30 átomos de carbono, com esqueleto acíclico do tipo mono-, di-, tri-, tetra- ou pentacíclico. Os triterpenóides pentacíclicos são os constituintes dominantes desta classe, e têm sido amplamente investigados, dos quais fazem parte os compostos α -amirina e β -amirina, mostrado na **Figura 4** (Mahato e Kundu, 1994).

 α -amirina β -amirina**Figura 4** – Fórmula estrutural dos isômeros alfa e beta amirina.

Algumas plantas contêm grandes quantidades de triterpenóides em seu látex e resinas cujas funções fisiológicas destes compostos é geralmente creditada a sua defesa química contra patógenos e herbívoros (Mahato, 1997).

A sua grande ocorrência e diversidade estrutural têm atraído a atenção quanto à evolução de suas atividades biológicas, como agentes antitumor, anticâncer, antiinflamatório, antiviral e antibacteriano. Por exemplo, Ling e cols., (1982) estudaram a relação entre a estrutura química e a atividade antineoplásica de alguns triterpenóides pentacíclicos e tetracíclicos. Embora as aplicações destes metabólitos secundários com sucesso como agente terapêutico sejam ainda limitadas, uma extensiva exploração das atividades nesta área tem ocorrido nos últimos anos (Mahato e cols., 1992).

Com base em pesquisa bibliográfica a amirina e seus ésteres foram descritos contendo várias atividades farmacológicas. Com atividade antinociceptiva Krogh e cols., (1999) demonstraram que amirina isolada da *Ipomoea pes-caprae* apresentou pronunciada atividade frente aos testes de contorções com ácido acético e formalina, justificando o uso popular desta planta para esta finalidade. Foi demonstrado efeito antiartrítico para o éster palmitato de alfa amirina (Kweifio-Okai e cols.,1995) (Kweifio-Okai e cols., 1994). A atividade antiinflamatória da alfa amirina extraída do látex do *Himatanthus sucuuba*, foi evidenciada no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos (Miranda e cols., 2000), também atividades como antimicrobiano (Ramesh e cols.,2001) e citostático (Gomez e cols., 1997) foram descritas para a amirina. Outras atividades, como inibidor enzimático, tal como, inibição seletiva de proteína quinase de células eucarióticas (Hasmeda e cols., 1999) e inibidor da serina protease (Rajic e cols.,2000) inibidor da lipoxigenase (Kwefio-Okai e Macrides, 1992). Efeitos ao nível de Sistema Nervoso Central, de ésteres da amirina, também foram estudados e estão registrados na literatura como efeitos inibitórios da atividade locomotora de camundongos, assim como efeitos sedativos e antidepressivo (Subarnas e cols., 1993a; Subarnas e cols., 1993b; Subarnas e cols., 1993c).

1.3 A inflamação

O processo inflamatório é iniciado por uma série de eventos complexos nos quais a mudança vascular é a que se inicia rapidamente e desenvolve-se durante as primeiras horas. Mudanças vasculares são reguladas por fatores que controlam a exudação, as quais ocorrem principalmente nas vênulas pós-capilares. Esta fase ocorre ou concomitantemente ou é desenvolvida em associação entre neutrófilos e o endotélio das vênulas pós-capilares, a qual contribui para uma fase mais prolongada de aumento da permeabilidade vascular. O exsudato fluido é absorvido para dentro dos linfáticos, aonde vão para glândulas linfáticas ou tecido linfático onde uma reação imune é então iniciada (Cirino e cols., 2003).

As reações que se desenvolvem nos tecidos em resposta a um dano ou a infecção são denominadas reações inflamatórias. Durante a reação inflamatória são identificados dois eventos diferenciados e que se relacionam: eventos vasculares e eventos celulares (Dannhardt e Kiefer, 2000).

Os eventos vasculares ocorrem na microcirculação. Em condições normais a microcirculação é formada por arteríolas que apresentam uma fina camada muscular. As arteríolas ramificam-se em vasos capilares, os quais fazem a ligação entre os compartimentos arteriolar e venular da microcirculação (Holland e Mikos, 2003).

O rubor e o aumento da temperatura local que caracterizam as regiões de inflamação se devem a maior quantidade de fluxo sanguíneo através de vasos locais. O aumento do fluxo sanguíneo por sua vez se deve a uma fugaz vasoconstrição arterial, que logo é seguida por dilatação ativa e intensa das arteríolas, capilares e veias do local. Os esfíncteres pré-capilares se relaxam e, como consequência, numerosos capilares, que estavam fechados, em repouso, se abrem aumentando significativamente o número de capilares funcionantes. O edema associado é resultado da exsudação dos vasos a partir das vênulas (Vane e Botting, 1987).

Os capilares sanguíneos são revestidos por células endoteliais que apresentam junções intercelulares muito firmes. O aumento da permeabilidade capilar é causado pela

retração das células endoteliais abrindo as junções intercelulares e possivelmente também pelo aumento no transporte vesicular através do endotélio. Isto permite que moléculas de maior peso molecular atravessem o endotélio, facilitando a entrada de anticorpo, complemento e moléculas de outros sistemas enzimáticos do plasma (sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas) no local da inflamação. Este aumento de líquido no local da inflamação leva a um aumento da drenagem linfática, que pode ser benéfico por permitir que o agressor seja retirado e levado até linfonodos onde entra em contato com células do sistema imune adaptativo. A causa imediata de tais modificações é a ação local dos chamados mediadores químicos da reação inflamatória aguda, também denominada primeira fase da inflamação (Feuerstein e Hallenbeck, 1987).

A Histamina e a serotonina estão envolvidas na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação. A liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos é desencadeada por injúria tecidual, complexo antígeno-anticorpo e pelo sistema complemento (Yokoyama e Tanabe, 1989).

A função final do sistema de coagulação é a produção de fibrina, elemento essencial para a formação do trombo sangüíneo. Este sistema pode ser desencadeado por injúria tecidual ou por fatores liberados pelos tecidos, e tem como função durante a resposta inflamatória delimitar a área inflamada impedindo a rápida disseminação do agressor (Kosaka e cols., 1994).

A função do Sistema Fibrinolítico dentro da coagulação sangüínea é de desfazer os trombos e deste modo manter um fluxo sangüíneo contínuo. Dentro da resposta inflamatória está envolvida na ativação do sistema complemento e participar do aumento da permeabilidade vascular (Kosaka e cols., 1994).

O Sistema de Cininas tem como função à ativação das plaquetas e produção de bradicinina e calicreína. A bradicinina é um potente agente vasoativo, produz vasodilatação, contração da musculatura lisa e produz dor. A calicreína é um agente quimiotático para neutrófilo (Yokoyama e Tanabe, 1989).

O Sistema Complemento participa da resposta imune adaptativa, porém pode ser ativado por uma via alternativa a partir de endotoxinas, lipopolissacarídeos de parede

bacteriana e por outros sistemas de enzimas plasmáticas. Tem função na opsonização de microorganismos, promove a degranulação de mastócitos e age como fator quimiotático de fagócitos (Vane e Botting, 1987).

As citocinas são um tipo especial de mediadores que podem ser produzidos pelas células do tecido afetado, e atraem linfócitos e fagócitos, novas drogas estão sendo desenvolvidas com ação neutralizante dos efeitos das citocinas como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), como mostrado na **Figura 5** (Ristimki e cols., 1994).

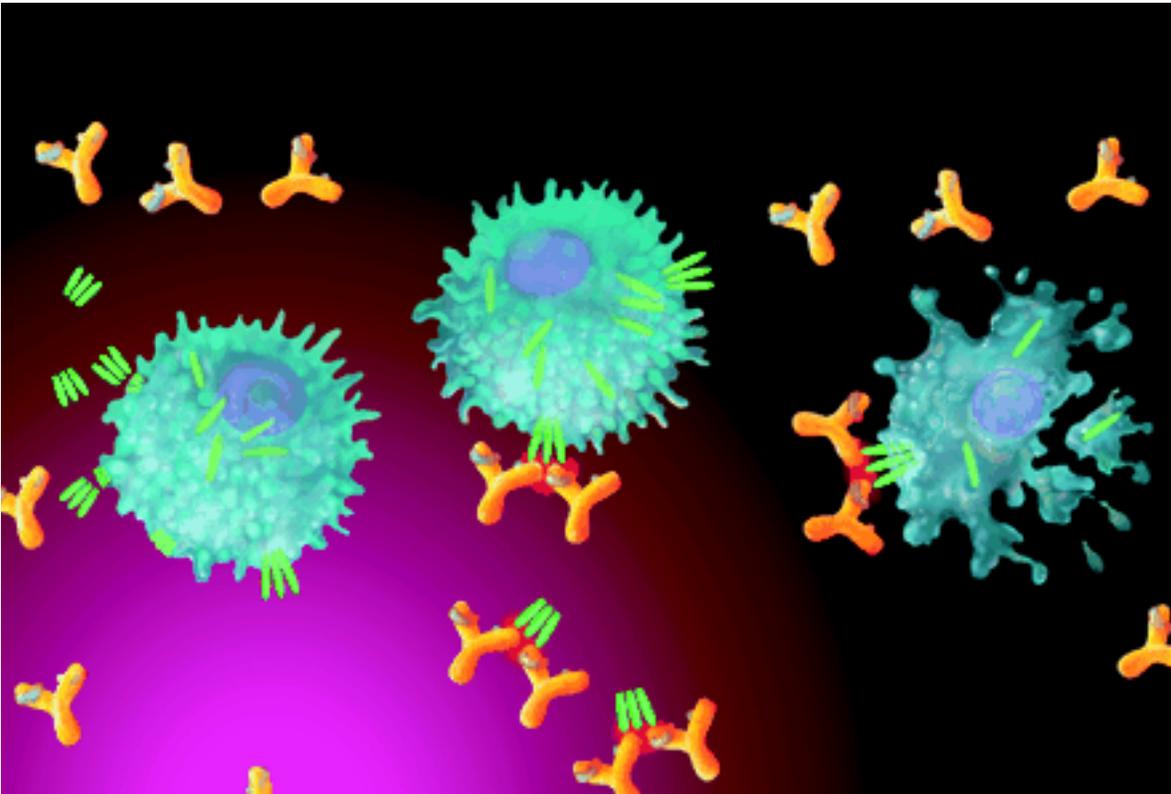


Figura 5 – Figura esquemática da ação de agentes terapêuticos bloqueando o efeito de citocinas. Citocinas são polipeptídeos reguladores de comunicação intercelular dentro do sistema imune. As células descritas acima são macrófagos e linfócitos T que respondem a citocinas (varas verdes). As estruturas em forma de Y representam agentes terapêuticos derivados de anticorpos que reconhecem as citocinas tanto na circulação como na superfície de receptores celulares, bloqueando seus efeitos.

O ácido araquidônico é encontrado em fosfolípídeos de membranas celulares em mastócitos, basófilos, macrófagos e células endoteliais. Os produtos gerados do metabolismo do ácido araquidônico são leucotrieno e prostaglandina. As prostaglandinas agem na vasodilatação, inibição da agregação de plaquetas, potencializa a dor, vasoconstrição e modula a função de macrófagos. Os leucotrienos promovem quimiotaxia, aumento da permeabilidade vascular, agregação e pavimentação de leucócitos nas células endoteliais e vasoconstrição (Dannhardt e Kiefer, 2001).

Em condições normais, os leucócitos circulam através de todos os tecidos do organismo. Cada grupo celular possui um padrão característico de migração. Quando ocorre inflamação em um determinado local ocorre uma reação de atração de leucócitos de diferentes populações para o tecido inflamado. O aumento da permeabilidade vascular associado à dilatação do leito capilar e venoso, além de outros fatores como o aumento da adesividade das plaquetas e a hemoconcentração, colaboram para um progressivo retardo da circulação na área inflamada. Uma das conseqüências é a mudança no padrão de circulação. Os elementos figurados do sangue circulam no centro da corrente e o fluido circula em contato com o endotélio. Na inflamação esta condição se modifica, as células passam a circular por toda a coluna sangüínea, facilitando o contato dos leucócitos com as células endoteliais. O processo de aproximação dos leucócitos à parede do vaso próximo ao local de inflamação é denominada marginação dos leucócitos, enquanto que sua adesão denomina-se pavimentação e sua passagem para o tecido chama-se diapedese. A migração para a área inflamada ocorre direcionada através de agentes quimiotáticos que são produtos de origem variada cuja ação resulta em marginação, pavimentação e diapedese de leucócitos para o tecido inflamado. São agentes quimiotáticos os fragmentos do sistema complemento ativado, fatores derivados do sistema fibrinolítico, sistema cininas, produtos de leucócitos e plaquetas (Holland e Mikos, 2003).

Na primeira fase da reação inflamatória, os neutrófilos são os mais numerosos leucócitos a entrarem no local afetado, encarregando-se da fagocitose, por exemplo, de bactérias. Os neutrófilos morrem durante o processo de destruição do invasor, constituindo a substância amarelada chamada pus. Outro efeito combinado de produtos de

neutrófilos e endotoxinas bacterianas (pirogênios) é a elevação da temperatura corporal, gerando o surgimento da febre. Outros leucócitos fagócitos, principalmente monócitos, entram secundariamente no local da inflamação. Os monócitos diferenciam-se em macrófagos, fagocitam bactérias e restos teciduais. Com o tempo as características da população celular no local da inflamação muda. Os macrófagos permanecem mais tempo no local que os neutrófilos e têm papel importante na resposta imune, pois vão apresentar antígenos aos linfócitos. Os eosinófilos, os basófilos e linfócitos passam a atuar principalmente em estágios mais avançados da inflamação desencadeando a resposta imune. A migração de grande quantidade de linfócitos para o local vai permitir que o pequeno número de linfócitos específicos para cada antígeno, tenha a chance de se encontrar com o antígeno (Holland e Mikos, 2003).

1.4 A agregação plaquetária

As plaquetas ou trombócitos são pequenas células anucleadas e discóides biconvexo (aproximadamente 2 a 3 μm de diâmetro), derivadas dos megacariócitos da medula óssea e possuem uma vida média de dez dias, e circulam normalmente na corrente sanguínea. No sangue periférico humano, o número de plaquetas é de 200.000 a 300.000 μl^{-1} . Seu tempo de vida usualmente varia de 7 a 10 dias e são retiradas da circulação pelo sistema reticulo endotelial ou por incorporação em tampões hemostáticos. (Brune e cols., 1991).

Acredita-se que sua principal função seja manter a integridade funcional do sistema circulatório, evitando perda de sangue. Após a lesão da parede de um vaso ocorre a exposição de componentes da mesma (fator de Von Willebrand, colágeno, trombina, endoperóxidos de prostaglandina, tromboxano A_2 , adenosina difosfato, adrenalina, fator ativador de plaquetas (PAF), fibronectina e fibrinogênio), que causam a adesão das plaquetas no local da injúria, seguida de ativação destas na presença de trombina. A ativação plaquetária causa uma mudança conformacional no receptor IIb/IIIa, que torna-se apto a ligar-se a diferentes glicoproteínas (ligantes), como fibrinogênio, fator von

Willebrand, fibronectina, e vitronectina, possibilitando a agregação entre as plaquetas (Hantgan e cols., 1990).

As plaquetas ativadas agem liberando mediadores químicos (Adenosina Difosfato, tromboxano A2, epinefrina, cálcio, etc.) que ativam plaquetas próximas, aumentando a adesão e formando um tampão. Finalmente esta ativação catalisa a conversão de protrombina em trombina, enzima proteolítica que transforma fibrinogênio em fibrina, formando uma rede aderente que estabiliza o coágulo sanguíneo (Lefkovits e cols., 1995).

Uma vez que plaquetas são muito sensíveis e podem rapidamente responder a esses agentes, sua atividade requer rigoroso controle, o que envolve a ação de inibidores endógenos, dentre os quais destacam-se em importância a prostaciclina e o óxido nítrico (Kroll e Schafer, 1998). As plaquetas ativadas exibem diferentes respostas que podem ser estudadas separadamente *in vitro*, mas que estão intimamente ligadas durante o processo de hemostasia *in vivo*. São elas: a adesão com alteração da forma, agregação e secreção (Barrie e cols., 1990).

O processo de adesão compreende o transporte por difusão das plaquetas até a superfície da lesão e a interação dos receptores da membrana plaquetária com seus ligantes nas estruturas da parede lesionada. Entre estas proteínas adesivas se incluem o colágeno, a fibronectina, o fator de von Willebrand, a laminina, a vitronectina e a tromboespadina (Kieffer e Phillips, 1990).

A plaqueta modifica sua forma de discóide para esferóide e emite pseudópodes. A mudança de forma, devido a contração do citoesqueleto, está associada a centralização de grânulos alfa, densos e lisossomais e parece ser pré-requisito para a secreção. A formação de pseudópodes facilita o contato das plaquetas entre si, o que é essencial para a agregação plaquetária. A **Figura 6** ilustra alterações das plaquetas após sua ativação. Em **A** está representada uma plaqueta, com sua forma discóide, antes da ativação. Podemos identificar, pela microscopia eletrônica, diversas organelas e, particularmente, os grânulos α e os corpos densos, que contêm várias substâncias que serão liberadas para o plasma através do sistema canalicular aberto. Os corpos densos

contêm: cálcio, serotonina, ATP e ADP. Os grânulos alfa contêm: fator von Willebrand, fibronectina, fibrinogênio, β -tromboglobulina, trombospondina, fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fatores da coagulação V e VIII e uma proteína neutralizadora de heparina (fator 4 plaquetário). Em **B** está representada a plaqueta após ativação. Após esta ativação, as plaquetas sofrem metamorfose, ou seja, tomam a forma esférica, irregular, com grandes pseudópodes. Os microtúbulos circunferenciais e os filamentos submembranas se contraem, comprimindo os diversos componentes dispersos no citossol. Com isso, esses elementos são espremidos e formam uma massa no centro da plaqueta acarretando a eliminação de diversas substâncias pelo sistema canalicular aberto, em especial, as contidas nos corpos densos e nos grânulos alfa (Siess, 1989).

Como ocorre em outras células, a ativação e secreção plaquetária estão reguladas por níveis de nucleotídeos cíclicos, pelo fluxo de entrada de cálcio, pela hidrólise de fosfolipídeos e pela fosforilação de proteínas intracelulares (Siess, 1989).

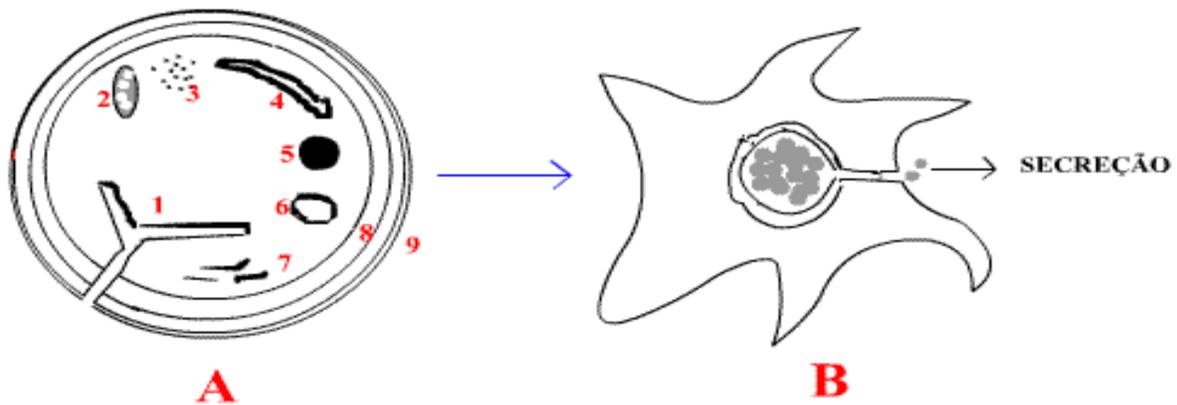


Figura 6 – Alteração morfológica da plaqueta após sua ativação. A = PLAQUETA NÃO ATIVADA - 1 = Sistema canalicular aberto. 2 = Mitocôndria. 3 = Grânulos de glicogênio. 4 = Sistema tubular denso. 5 = Corpo denso. 6 = Grânulo alfa. 7 = Microfilamentos. 8 = Microtúbulos circunferenciais. 9 = Membrana plaquetária. Entre a membrana plaquetária e os microtúbulos circunferenciais há os filamentos submembranas. B = PLAQUETA ATIVADA - Deformação das plaquetas e contração dos microtúbulos circunferenciais e dos filamentos submembrana com fusão dos grânulos.

Em estudo *in vitro*, os principais agonistas plaquetários de relevância fisiológica, parece ser a trombina, o ADP, o colágeno e o ácido araquidônico. Existem receptores específicos na superfície da plaqueta para cada um destes agonistas (Weiss, 1982).

A união de agonistas, tais como adrenalina, colágeno ou trombina a receptores de superfície das plaquetas, ativa duas enzimas da membrana: fosfolipase C e Fosfolipase A₂. A ativação da fosfolipase A₂ leva a liberação de ácido araquidônico que se converte por meio da ciclooxigenase em endoperóxido de prostaglandinas, para forma por último o potente agregante plaquetário tromboxano A₂ (TXA₂), assim como prostaglandinas estáveis como PGD₂ que também inibe a agregação plaquetária. O TXA₂ tem atividade ionofórica, facilitando o transporte de cálcio através de membranas intercelulares (Gerrard e White, 1978).

A ativação da fosfolipase C produz a hidrólise dos fosfolípidos de membrana fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), liberando Diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP₃). O IP₃ intervém no movimento de cálcio dentro do citosol plaquetário e estimula a fosforilação das cadeias leves de miosina. Esta última interage com a actina para facilitar o movimento dos grânulos e a mudança de forma das plaquetas. O DAG ativa a proteína quinase C que, por sua vez, fosforila uma proteína que pode servir para regular a secreção dos grânulos plaquetários (Badimon e cols., 1990).

Existe finalmente, um mecanismo equilibrado que controla a velocidade e a extensão da ativação plaquetária. O TXA₂ aumenta a atividade da fosfolipase C, que estimula a ativação e a secreção plaquetária. A prostaciclina PGI₂, um produto do ácido araquidônico das células endoteliais, inibe a ativação das plaquetas mediante a elevação dos níveis intraplaquetários de AMP cíclico (Badimon e cols., 1990).

Comum a todos os agentes agregantes endógenos é a sua ligação com receptores específicos na superfície da plaqueta. A transdução, através da membrana, do sinal emitido pela ativação do receptor, é feita por proteínas G, proteínas reguladoras de ligação ao nucleotídeo guanina (Siess, 1989; Kroll e Schafer, 1989; Brass e cols., 1993).

Esses mecanismos de transdução estimulam e regulam sistemas efetores específicos, tais como a hidrólise de fosfolípido inositol, induzida pela fosfolipase C e canais iônicos. A hidrólise de fosfolípido inositol, via fosfolipase C, modula os níveis dos mensageiros intracelulares: 1,4,5-trifosfato inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). IP_3 libera cálcio (Ca^{2+}) do sistema tubular denso da plaqueta, contribuindo para o aumento da concentração do cátion no citoplasma e DAG, por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC). A mobilização de Ca^{2+} e a ativação de PKC juntos estimulam de modo sinérgico, diversas respostas da plaqueta inclusive a liberação de ácido araquidônico de estoques de fosfolípidios de membrana e a reação de secreção (Siess, 1989; Kroll e Schafer, 1989; Herman, 1998).

A exposição do receptor de fibrinogênio, glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), um receptor da classe das integrinas, presente na superfície da plaqueta, depende do aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma e é essencial para a agregação. Isso ocorre quando a plaqueta adquire a forma esférica com resultante alteração da conformação do receptor, tornando-o receptivo. A ligação de moléculas de fibrinogênio com os receptores GPIIb/IIIa forma pontes entre plaquetas adjacentes e possibilita a agregação. A **Figura 7** mostra o complexo GP Ia/IIa que funciona como receptor da fibrila de colágeno para o vWF. Já os complexos GP Ib/IX/V e IIb/IIIa são os receptores plaquetários para o vWF. Desse modo, o vWF serve de ponte entre os citados receptores promovendo, assim, a adesividade da plaqueta ao colágeno que foi exposto após a lesão do endotélio. Nesse momento em que a plaqueta adere ao colágeno, ela é ativada e libera, além de outras substâncias, o ADP que é um ativador plaquetário. Por outro lado, o complexo GP Ib/IX/V, também é receptor para a trombina, enzima que promoverá a ativação plaquetária juntamente com o ADP. O fibrinogênio também pode mediar a adesividade das plaquetas à uma superfície e entre as plaquetas. O fibrinogênio solúvel somente propicia a agregação das plaquetas quando estas estão ativadas pelos agonistas, tais como o ADP e a trombina. O receptor das plaquetas para esse fim é a GP IIb/IIIa. Assim, o fibrinogênio faz uma ponte entre os receptores GP IIb/IIIa de duas plaquetas. Esse receptor também é usado pelo fibrinogênio adsorvido em superfície, porém essa

ligação, ao contrário da anterior, não requer a ativação plaquetária (Lefkovits e cols., 1995; Herman, 1998).

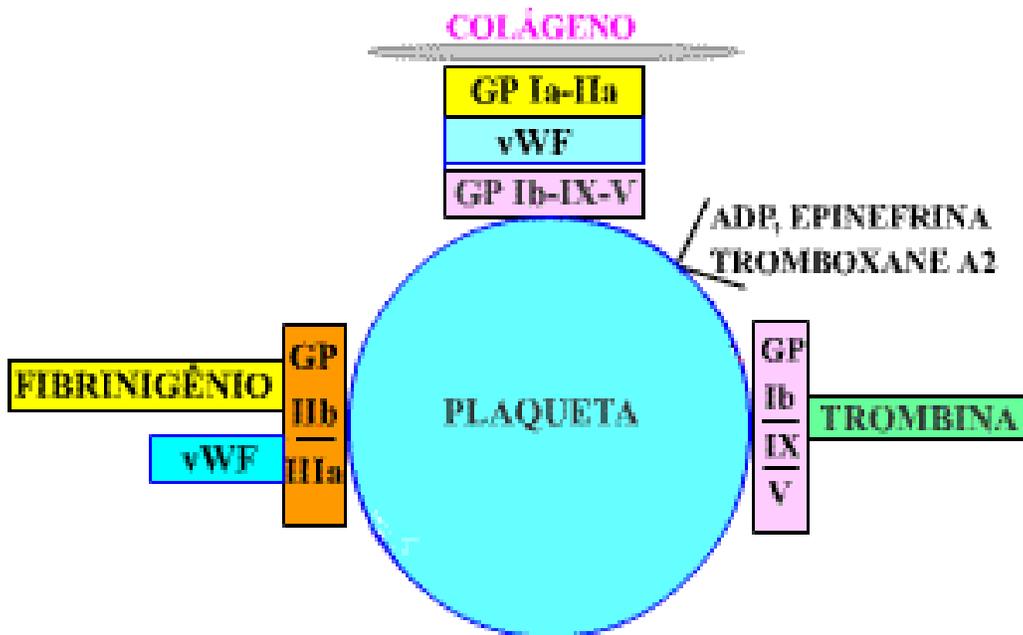


Figura 7 - Participação de receptores na ativação plaquetária. : GP Ia/IIa = receptor da fibrila de colágeno (específico para a plaqueta). vWF = Fator von Willebrand. GP Ib/IX/V = receptor da plaqueta para o vWF. GP IIb/IIIa = receptor da plaqueta para o vWF e para o fibrinogênio. GP Ib/IX/V = receptor da plaqueta para a trombina.

Dois tipos de agregação, mencionados a seguir, são observados *in vitro*. A agregação primária, reversível que ocorre sem a reação de liberação e pode estar relacionada a funções fisiológicas das plaquetas, ainda não esclarecidas. A agregação secundária irreversível está associada a função hemostática das plaquetas e é consequência da reação de liberação. Esta compreende a liberação do ácido araquidônico e a produção de seus metabólitos, especialmente resposta de secreção plaquetária (Siess, 1989).

Nas plaquetas humanas, a hidrólise de fosfolipídios de membrana, com liberação do ácido araquidônico, depende principalmente da ativação de fosfolipase A₂ (Kroll e Schafer, 1989; McNicol e Shibou, 1998). Uma vez livre, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas vias. Uma delas compreende a ação da enzima 12-lipoxigenase sobre o ácido araquidônico, com formação de 12-hidroperoxiácido eicosatetranoico (12-HPETE), que é rapidamente convertido em 12-hidroxiácido eicosatetranoico (12-HETE). Esses dois compostos são agentes quimiotáticos para polimorfonucleares. A outra via que resulta na formação de TXA₂ envolve a atuação das enzimas ciclooxigenase e tromboxano sintase. Inicialmente, a produção de endoperóxidos de prostaglandina (PGG₂ e PGH₂), a partir do ácido araquidônico, é catalisada pela ciclooxigenase. Em seguida, a tromboxano sintase promove a conversão desses intermediários instáveis em TXA₂ (Brüne e cols., 1991). O TXA₂ produz vasoconstrição local e induz a reação de secreção que leva a agregação secundária. Trata-se de um composto muito instável, que rapidamente transforma-se em TXB₂, metabólito biologicamente inativo (Fitzgerald, 1991).

A secreção da plaqueta mediada pela produção de TXA₂, consiste na liberação de grânulos alfa, grânulos densos e do lisossomo. Os grânulos alfa contêm muitas proteínas, inclusive o fibrinogênio, fator Von Willebrand, fibronectina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator plaquetário-4 e beta-tromboglobulina. Os grânulos densos têm como constituintes o ADP, ATP e cálcio (Ca²⁺). Nos lisossomos

estão presentes hidrolases ácidas, tais como beta-glicuronidase, N-acetil-glicosaminidase, catepsina e outras enzimas (Vermylen e cols., 1983).

A rápida formação de grandes agregados requer mecanismos de amplificação eficientes que compreendem a formação de TXA₂ e secreção de ADP. Estes quando alcançam o espaço extracelular, durante a reação de liberação, ligam-se a receptores específicos na superfície de plaquetas e induzem a hidrólise de fosfolipídio inositol, mobilização de cálcio, fosforilação de proteínas e exposição de receptor de fibrinogênio, ampliando desse modo as respostas de plaquetas na vizinhança (Siess, 1989; Herman, 1998).

Ambas as vias, formação de TXA₂ e liberação de ADP, são mediadoras de secreção e agregação plaquetária irreversível induzidas por muitos estímulos. Contudo, estes diferem quanto à necessidade da atividade da ciclooxigenase para induzir tais respostas. Estímulos fracos como de ADP ou adrenalina, necessitam de agregação primária e produção de TXA₂. Estímulos fortes como aqueles de trombina ou colágeno, em altas concentrações, produzem secreção e agregação irreversível, através de mecanismos independentes da formação de TXA₂. Porém, em baixas concentrações, esses agonistas induzem agregação que depende inteiramente da formação de TXA₂ e secreção de ADP (Siess, 1989; Herman, 1998).

O fator ativador de plaquetas (PAF) não é mais considerado a terceira via de ativação plaquetária, uma vez que estudos em plaquetas humanas demonstraram que a agregação induzida por PAF é modulada por inibidores da ciclooxigenase, indicando uma inter-relação com outras vias, particularmente aquela dependente da produção de TXA₂ (Siess, 1989; Herman, 1998).

1.5 A Ansiedade e modelos experimentais farmacológicos

A ansiedade pode ser definida como um sintoma de medo, temor, apreensão e incerteza sem causa justificada. Quando se acompanha de sintomas vegetativos como suor, taquicardia, etc, recebe o nome de angústia. Os ansiolíticos são psicofármacos

capazes de controlar a ansiedade. Na atualidade os mais utilizados são os benzodiazepínicos e a buspirona. O primeiro grupo possui efeito ansiolítico, hipnótico-sedante (com o que ajuda a tratar a insônia), relaxante muscular e anticonvulsivante. A buspirona é um ansiolítico puro com apenas efeito hipnótico ou tranqüilizante, entretanto seus efeitos demoram de 2 a 3 semanas para aparecer e em geral são menos eficazes que os benzodiazepínicos (Rang e Dale,1997).

Tem-se sugerido que vários sistemas cerebrais estejam envolvidos com o mecanismo da ansiedade. Entre eles destacam-se os sistemas gabaérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, aminoácidos excitatórios, colecistocinina e hormônio liberador de corticotrofina (Rang e Dale,1997).

O grupo de drogas mais importante, utilizado como ansiolítico são os benzodiazepínicos, estes causam redução da ansiedade e da agressão, sedação, o que resulta em melhora da insônia, relaxamento muscular e perda da coordenação motora e supressão de convulsões. Os benzodiazepínicos agem ligando-se a um local regulador específico no receptor GABA_A, exacerbando assim o efeito inibitório do GABA (Rang e Dale, 1997).

Desde as primeiras demonstrações de que antagonistas da neurotransmissão serotoninérgica promoviam efeitos ansiolíticos comparáveis aos dos benzodiazepínicos em testes de conflito (Graeff e Schoenfeld, 1970), o papel da serotonina (5-HT) na ansiedade vem sendo amplamente investigado. Estes resultados, em conjunto com as observações de que os ansiolíticos benzodiazepínicos diminuía a atividade dos neurônios serotoninérgicos, favoreceram a proposição da teoria serotoninérgica clássica da ansiedade, a qual atribui um papel ansiogênico para a 5-HT (Stein, Wise e Berger, 1973).

Mais recentemente, a própria utilização de drogas serotoninérgicas com potencial ansiolítico parece fortalecer esta hipótese. Por exemplo, antagonistas dos subtipos 5-HT₂ (como a ritanserina e a ketanserina) e 5-HT₃ (como o ondansetrom, o zacopride e o BRL 46470) promovem efeitos ansiolíticos em vários modelos animais (Cruz e cols., 1995, 1997; Handley e McBlane, 1993) e em ensaios clínicos com humanos (Graeff e cols., 1996; McNair e cols., 1982).

Estudos neuroquímicos também indicam que a buspirona, primeiro ansiolítico seletivo de ação serotoninérgica introduzido na clínica médica (Ninan e cols., 1998), atua preferencialmente em nível dos auto-receptores 5-HT_{1A} nos núcleos da rafe (Hoyer e Martin, 1997). A ativação desses auto-receptores pré-sinápticos diminui a quantidade de 5-HT em nível pós-sináptico (provavelmente na amígdala e hipocampo). Desta forma, a ação ansiogênica da 5-HT parece ser minimizada sob o efeito dessas drogas.

Comportamento exploratório é o nome dado a expressão comportamental da curiosidade que acontece de forma espontânea nos animais. Muitas explicações foram propostas para explicar as origens do comportamento exploratório. Tais explicações vão desde o conceito simples da existência de um impulso exploratório até teorias do tipo homeostático, segundo as quais, os animais explorariam devido a necessidade de alcançar níveis adequados de, por exemplo, energia ou água. Para isso, sensações como a fome ou a sede, ou mesmo o desejo sexual, seriam os deflagradores do comportamento exploratório. Outras explicações sugerem que é a necessidade de obter informação acerca do ambiente o fator que impulsiona o comportamento exploratório. Contudo, o conhecimento preciso dos padrões e dos parâmetros do comportamento exploratório ainda é escasso (Renner e Seltzer, 1991).

Da mesma forma, ainda não existe uma compreensão completa do papel dos diversos estímulos aversivos no comportamento exibido por roedores em situações tais como, dentre muitas outras, o labirinto em cruz elevado. Foi proposta a presença de um medo inato aos espaços abertos (Hirsjärvi e Väliaho, 1995; Rex e cols., 1996; Ramos e cols., 1997), embora os mecanismos por meio dos quais os roedores percebem essa qualidade de amplidão dos espaços ainda não tenham sido definidos precisamente. De acordo com Becker e Grecksh (1996), o sistema visual seria de pouca utilidade na exploração de um ambiente. De fato, esses autores não encontraram diferenças entre ratos que exploravam o labirinto em cruz elevado com luminosidade de diferentes intensidades (30, 300 e 900 Lux). Contudo, autores como Valle (1970), Aitken (1974), Schiffman e cols (1970), Morato e Castrechini (1989) e Ambrogi-Lorenzini e cols. (1990) relataram que a iluminação da sala experimental é um fator de muita importância nesses tipos de

testes comportamentais. Existe um outro grupo de autores que propõem que a ausência de informação de tigmotatismo constitui um fator de muita importância para a percepção dos espaços abertos (Valle, 1970; Ahl, 1986; Treit e Fundytus, 1989; Treit e cols., 1993a; Simon e cols., 1994). Obviamente o rato, assim como qualquer outro animal, é um organismo cujo funcionamento não depende de um ou mesmo de dois ou três sistemas isolados. Portanto, a compreensão do comportamento exploratório requer uma visão integrada e ampla do animal e da sua ecologia.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

A resposta inflamatória é um processo vital e desenvolve um papel importante na saúde e na doença. A palavra inflamação pode ser considerada um termo que acompanha várias doenças. Doenças inflamatórias típicas, como artrites, colites, doença inflamatória intestinal, asma e outras patologias como ateroscleroses, mal de Alzheimer e esclerose múltipla apresentam componentes inflamatórios. A inflamação é um tema comum em várias e aparentemente distintas patologias. Baseados em estudos anteriores que demonstram atividade antiinflamatória da amirina e seus ésteres é que procuramos avaliar efeitos farmacológicos da mistura isomérica de alfa e beta amirina extraída da resina do *Protium heptaphyllum* onde as atividades antinociceptivas e antiinflamatória pudessem ser melhor investigadas utilizando vários modelos em ratos e camundongos. Outras atividades farmacológicas também foram alvo deste estudo como atividade antiagregante plaquetária e ações em nível de Sistema Nervoso Central.

2.2 Específicos

Determinar as atividades antinociceptiva, antiinflamatória (efeitos profilático e terapêutico), utilizando vários modelos com animais, com diferentes concentrações de amirina administrada em pelo menos duas vias distintas (via oral e intraperitoneal) que possam comprovar estes efeitos e esclarecer os mecanismos de ação envolvidos. Avaliar a atividade antiagregante plaquetária em PRP de sangue humano utilizando vários agonistas e com concentrações diferentes da amirina e finalmente verificar ações em nível de Sistema Nervoso Central, utilizando modelos com camundongos.

MATERIAL
MATERIAL

3. MATERIAL

3.1 Planta

A planta foi coletada no mês de setembro de 1999, na cidade do Crato, no estado do Ceará, Brasil. Identificada pelo Prof. A. G. Fernandes e E. Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, encontrando-se depositada no herbário Prisco Bezerra e catalogada como exsicata de número 28509. A parte da planta utilizada para extração da alfa e beta amirina foi a resina.

3.2 Animais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss, sexo masculino, adulto, pesando entre 20 a 30 g, foram oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas plásticas fechadas em cima com telas de ferro mantidos a uma temperatura média de 24°C, com comida e água sendo oferecida a vontade. Os experimentos foram executados de acordo com o guia de usos e cuidados de animais de laboratório, do *US Department of Health and Human Services, Institute of Laboratory Animal Resources*, Washington DC, 1985.

3.3 Sangue humano

As amostras de sangue foram colhidas de doadores alunos, funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e também de pacientes do Hospital Universitário Walter Cantídio onde foram selecionados criteriosamente, conforme descrito em 4.9.1, e obtido um *pool* de quatro pacientes em cada experimento executado.

3.4 Reagentes, soluções e outros

- Ácido acético glacial – (Vetec, Brasil).
- Ácido acetilsalicílico – (Sigma, U.S.A.).
- Ácido araquidônico – (Helena Laboratories, U.S.A.).
- Adenosina-difosfato (ADP) – (Sigma, U.S.A.).
- Bicarbonato de Sódio – (Reagen, Brasil).
- Carragenina (λ) tipo IV – (Sigma, U.S.A.).
- Cloreto de Sódio – (Nuclear, Brasil).
- Ciproheptadina – (Sigma, U.S.A.)
- Colágeno – (Helena Laboratories, U.S.A.)
- Dextrano – (Sigma, U.S.A.)
- Diazepam 5mg/mL – (Cristália, Brasil)
- Formaldeído – (Reagen, Brasil)
- Indometacina – (Sigma, U.S.A.)
- Sulfato de Morfina 1 mg/mL (Dimorf) – (Cristália, Brasil)
- Naloxona – (Sigma, U.S.A.)
- Talidomida – (FURP, Brasil)
- Tween 80 – (Vetec, Brasil)

3.5 Equipamentos

- Balança analítica – *Metler* (Suíça)
- Centrífuga – modelo 215 – *Fanem* (Brasil)
- Agregômetro – modelo 450 – *Chrono – Log Co.* (U.S.A.) e registrador da mesma procedência
- Pletismógrafo – modelo 7150 – *Ugo Basile* – (Itália)
- Placa Quente – modelo DS37 – *Ugo Basile* – (Itália)
- Banho de água agitador – modelo G76 – *New Brunswick Scientific* (U.S.A.)

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Obtenção da resina do *Protium heptaphyllum*

A resina foi obtida após serem feitas incisões no caule da planta, o que fez com que após alguns dias a planta fosse naturalmente produzindo a resina. Esta foi, então, retirada em quantidade equivalente a 20 g de resina bruta.

4.2 Obtenção da alfa e beta amirina

A mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI) foi obtida pelo Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, a partir de 20 g de resina fresca. A resina foi então adsorvida em sílica gel e acondicionada em uma coluna contendo sílica gel. A eluição foi feita com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puro. O eluato clorofórmico, com rendimento de 5,2 g, apresentou-se como um sólido de cor amarelo-claro. Este sólido foi adsorvido em sílica gel e empacotado em coluna contendo sílica gel, após eluição com hexano puro e mistura binária de hexano/acetato de etila, as frações 46 – 48 foram reunidas após análise por cromatografia em camada delgada de sílica gel, fornecendo 450 mg da mistura isomérica de alfa e beta amirina (**Figura 8**), que foi identificada por espectrofotometria de infravermelho (KBr) ν_{\max} cm^{-1} (3300, 1480 e 1050) e NMR ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) e ponto de fusão entre 179-181°C, de acordo com a literatura (Mahato e Kundu, 1994).

Extração e purificação da mistura isomérica de alfa e beta amirina AMI.

RFH=Fração Hexânica da Resina; RFC=Fração Clorofórmica da Resina; RFA=Fração de Acetato de Etila da Resina; RFM=Fração Metanólica da Resina; CC=Cromatografia de Coluna; Hex=Hexano; AcOEt=Acetato de Etila ; F()=Frações; CCD=Cromatografia de Coluna Delgada.

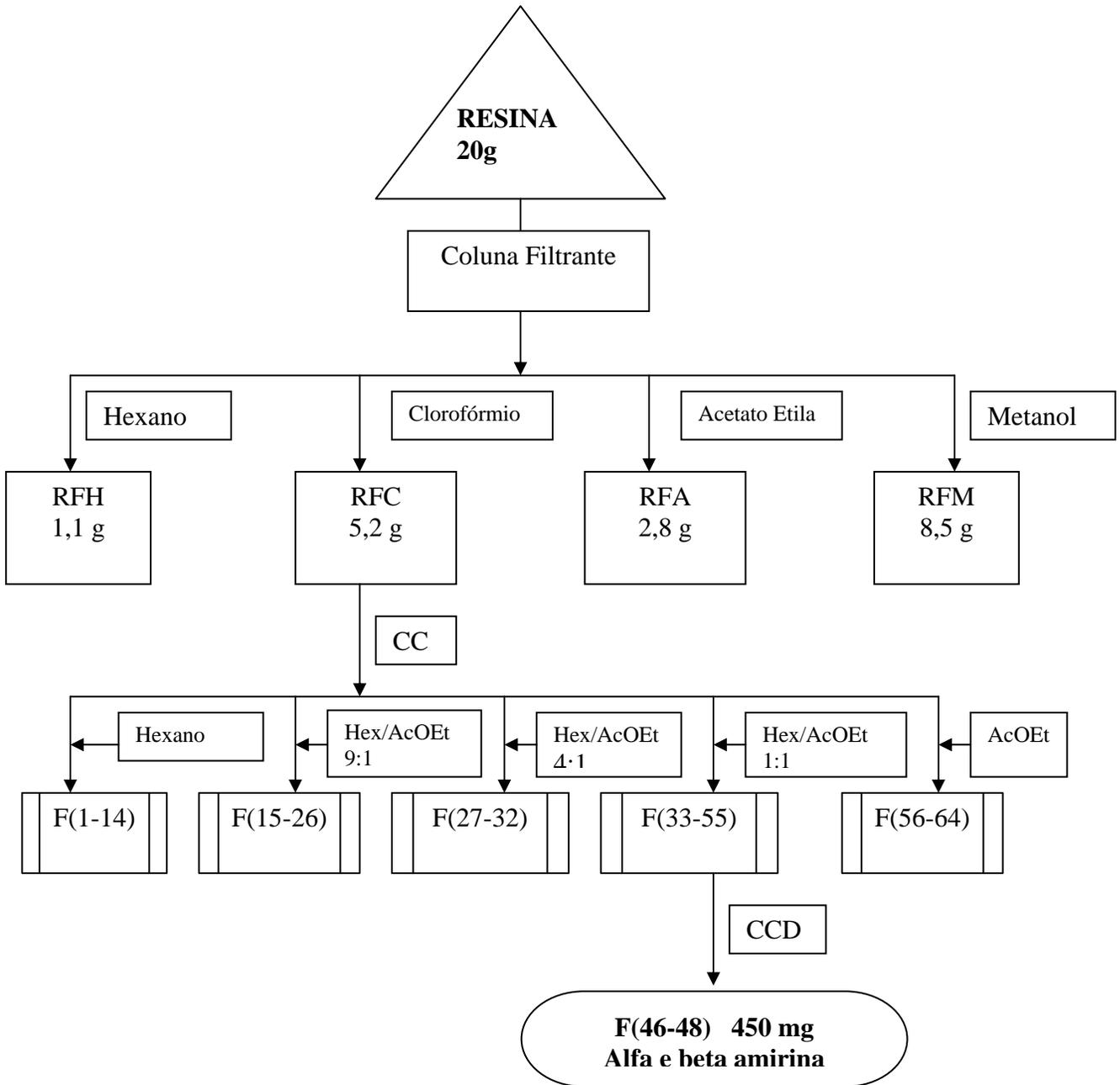


Figura 8 – Fluxograma da obtenção da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI)

4.3 Preparação da amostra e doses utilizadas

A mistura isomérica de alfa e beta amirina é um pó branco, amorfo, apresentando um leve odor, com baixa solubilidade aquosa, mas solúvel em solventes orgânicos. A mistura foi suspensa com Tween 80 à 0,5% e sonicada antes do uso e o pH medido foi 6,0. As doses utilizadas variaram dependendo do teste de 5 a 100 mg/kg, pelas vias intraperitoneal e oral.

4.4 Determinação da atividade antinociceptiva da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI)

4.4.1 Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g), divididos em grupos de 6 a 14 animais cada, foram utilizados para investigar a ação da AMI no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, segundo o método de Koster e cols., 1959, conforme descrito a seguir.

AMI foi testada nas doses de 5, 10 e 50 mg/Kg, administradas no volume de 10 mL/Kg, i.p., uma única vez, 30 min antes da injeção da solução de ácido acético 0,6%, no volume de 10 mL/Kg, i.p. A partir de 10 minutos após o tratamento dos animais com o ácido acético, o número de contorções foi registrado durante 20 minutos. AMI também foi testada nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg, v.o., administrado no volume de 10 mL/Kg, 1 hora antes da injeção de ácido acético, o número de contorções foi registrado conforme descrito anteriormente. Neste experimento os grupos controles foram tratados com suspensão de Tween 80 a 0,5%, i.p. e v.o., respectivamente (veículo de dissolução da AMI). A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey – Kramer, para comparações múltiplas.

4.4.2 Teste da formalina

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g), divididos em grupos de 6 a 12 animais cada, foram utilizados para determinar o efeito da AMI no teste da formalina, segundo o método de Fasmer e cols., 1985 e Tjolsen e cols., 1992, conforme descrito a seguir.

AMI foi testada nas doses de 10 e 50 mg/Kg, administrado no volume de 10 mL/Kg, i.p., uma única vez, 30 minutos antes da injeção intraplantar de 20 µL da solução de formalina 1%, na pata traseira, direita do animal. O tempo (em segundos), gasto pelo animal lambendo a pata, foi registrado durante os primeiros 5 minutos (fase inicial ou 1ª fase) e de 20 a 25 minutos (fase tardia ou 2ª fase) após a injeção de formalina. AMI também foi testada nas doses de 5, 10 e 50 mg/Kg, v.o., uma única vez, 1 hora antes da injeção intraplantar de formalina seguindo a mesma metodologia acima citada. Os grupos controles receberam suspensão de Tween 80 a 0,5% (veículo de dissolução da AMI) no volume de 10mL/Kg, i.p. e v.o., respectivamente. A morfina (fármaco opióide) foi utilizada como controle positivo, na dose de 10 mg/Kg, no volume de 10mL/Kg, i.p. Esse teste foi realizado a temperatura ambiente de 26 – 28 °C, na ausência de fatores estressantes tais como sons, odores e grande luminosidade, que pudessem causar alterações no comportamento dos animais.

Para investigar o envolvimento do sistema opióide, no efeito de AMI sobre a nocicepção induzida por formalina, foi utilizado grupo tratado com AMI 10mg/Kg, i.p., 15 minutos após a administração de naloxona (antagonista opióide) na dose de 5 mg/Kg, no volume de 10 mL/Kg, s.c. e 30 minutos antes da injeção de formalina e também um grupo que recebeu morfina 10 mg/Kg, i.p., 15 minutos após a administração de naloxona 5 mg/Kg, s.c. e 30 minutos antes da injeção de formalina, além dos grupos citados anteriormente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada como descrito em 4.4.1.

4.4.3 Teste da placa quente

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g), divididos em grupos de 10 a 12 animais cada, foram utilizados para investigar a ação da AMI no teste da placa quente, segundo o método de Eddy e Leimback (1953), conforme descrito a seguir.

No teste, foram empregados somente animais previamente selecionados, ou seja, aqueles que ao serem colocados sobre uma placa de metal aquecida a $55,0 \pm 0,5$ °C, responderam ao estímulo térmico em cerca de 20 segundos, lambendo as patas traseiras e/ou saltando sobre a placa.

AMI foi testada nas doses de 10 e 50 mg/Kg, administradas no volume de 10 mL/Kg, i.p., uma única vez. Para cada animal, o tempo (em segundos) decorrido até a manifestação de resposta ao estímulo térmico, foi registrado antes e com 30, 60 e 90 minutos após a administração de AMI. Também foram testadas as doses de 50 e 100 mg/Kg, administradas no volume de 10 mL/Kg, v.o., uma única vez, seguindo a metodologia acima citada. Os grupos controles receberam suspensão de Tween 80 a 0,5% (veículo de dissolução da AMI), no volume de 10 mL/Kg, i.p. e v.o., respectivamente. O envolvimento do sistema opióide também foi investigado com grupos tratados com morfina 10 mg/Kg, i.p. uma única vez, outro grupo tratado com AMI 50 mg/Kg, i.p. 15 minutos depois de administrado naloxona 5 mg/Kg, s.c. e ainda outro tratado com morfina 10 mg/Kg, i.p. 15 minutos depois de administrado naloxona 5 mg/Kg, s.c., seguindo a metodologia descrita acima. Decorrido o tempo máximo de 45 segundos, o animal que não reagiu foi retirado do teste e substituído, evitando desse modo à ocorrência de danos as suas patas. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.4.1.

4.5 Determinação da atividade antiedematogênica da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI) em camundongos

4.5.1 Modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g) divididos em grupos de 8 animais cada, foram utilizados para determinar a ação da AMI no modelo de edema de pata induzido por carragenina, segundo o método de Winter e cols., 1962, conforme descrito a seguir.

AMI foi testada nas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg, administradas no volume de 10 mL/Kg, i.p., 30 minutos antes da injeção intraplantar de 0,05 mL da solução de carragenina 1% na pata traseira, direita do animal. O volume da pata foi medido antes e com 1, 2, 3 e 4 horas após a administração de carragenina, foi determinado pelo cálculo da diferença entre o volume da pata medido nesses intervalos de tempo e o seu volume determinado antes da injeção de carragenina. O grupo controle recebeu solução de Tween 80 a 0,5% (veículo de dissolução da AMI), no volume de 10 mL/Kg, i.p.

AMI também foi testada nas doses de 50 e 100 mg/Kg, v.o., uma única vez, 1 h antes da injeção de carragenina. Para cada animal, o volume do edema foi determinado antes e com 1, 2, 3 e 4 h após a administração da carragenina, conforme descrito anteriormente. O grupo controle recebeu solução de Tween 80 a 0,5% (veículo de dissolução da AMI), no volume de 10 mL/Kg, v.o. A indometacina na dose de 10 mg/Kg, v.o. foi utilizada como controle positivo. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey – Kramer para comparações múltiplas.

4.5.2 Determinação da potencialização do efeito antiedematogênico da indometacina pela AMI em edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g) divididos em grupos de 6 a 8 animais cada, foram utilizados para avaliar o efeito sinérgico entre a AMI e indometacina no modelo de edema de pata induzido por carragenina, segundo o método de Winter e cols., (1962), conforme descrito anteriormente.

A indometacina foi administrada nos camundongos em duas doses diferentes, 10 mg/Kg, v.o., e uma menor de 2 mg/Kg, v.o. A AMI foi administrada na dose de 5 mg/Kg, por via intraperitoneal. Quando administradas em associação foram usadas doses de AMI 5 mg/Kg, i.p. e após 15 minutos, indometacina 2 mg/Kg, v.o. Tween 80 a 0,5%, i.p., foi utilizado como controle, 30 minutos antes da injeção intraplantar de 0,05 mL da solução de carragenina 1% na pata traseira, direita do animal. Todas as doses foram aplicadas no volume de 10mL/kg. O volume da pata foi medido antes e com 1, 2, 3 e 4 horas após a administração de carragenina, foi determinado pelo cálculo da diferença entre o volume da pata medido nesses intervalos de tempo e o seu volume determinado antes da injeção de carragenina. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey – Kramer para comparações múltiplas.

4.5.3 Modelo de edema de pata induzido por dextrano em camundongos

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g) divididos em grupos de 8 animais cada, foram utilizados para determinar a ação da AMI no modelo de edema de pata induzido por dextrano, segundo método de Parrat e West (1958), conforme descrito a seguir.

AMI foi testada nas doses de 5, 10 e 25 mg/Kg, administradas no volume de 10 mL/Kg, i.p., 30 minutos antes da injeção intraplantar de 0,05 mL da solução de dextrano 6% na pata traseira, direita do animal. O volume da pata foi medido antes e com

1, 2, 3 e 4 horas após a administração de dextrano, foi determinado pelo cálculo da diferença entre o volume da pata medido nesses intervalos de tempo e o seu volume determinado antes da injeção de dextrano. Foi também, feito nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg, v.o., 1 hora antes da injeção de dextrano, para cada animal o volume da pata foi medido antes e com 1, 2, 3 e 4 horas após a administração do dextrano conforme descrito anteriormente. Como controle positivo utilizamos um grupo com ciproheptadina 5 mg/Kg, v.o. Os grupos controles receberam solução de Tween 80 a 0,5% no volume de 10 mL/Kg, i.p. e v.o., respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.5.1.

4.6 Avaliação do efeito terapêutico (curativo) administrando a AMI após a formação de um edema.

4.6.1 Reversão do edema inflamatório induzido pela carragenina

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g) divididos em grupos de 08 animais cada, foram utilizados para determinar a ação da AMI no modelo de reversão do edema de pata induzido pela carragenina, segundo método descrito a seguir.

Antes de aplicar o agente edematogênico todas as patas direita traseira dos animais selecionados foram medidas em pletismógrafo acoplado a registrador, a seguir a carragenina 1% foi administrada por via intraplantar (0,05mL) na pata medida. A AMI foi testada nas doses de 25 e 50 mg/Kg, administradas no volume de 10mL/Kg, i.p. O volume da pata foi novamente medido após a 1ª e 2ª hora de aplicação da carragenina e imediatamente após a 2ª hora foi aplicada a AMI. E em seguida as patas foram medidas na 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 24ª e 48ª hora após a administração de carragenina. O volume da pata foi determinado pelo cálculo da diferença entre o volume da pata medido nesses intervalos de tempo e o seu volume determinado antes da injeção de carragenina. Foi também, feito AMI nas doses de 50 e 100 mg/Kg, v.o., imediatamente após a 2ª hora depois da injeção de carragenina, o procedimento foi idêntico ao citado anteriormente. Como controle

positivo utilizamos um grupo com indometacina 10 mg/Kg, v.o. Os grupos controles receberam solução de Tween 80 à 0,5%, no volume de 10 mL/Kg, i.p. e v.o., respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.5.1.

4.6.2 Reversão do edema inflamatório induzido pelo dextrano

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g) divididos em grupos de 08 animais cada, foram utilizados para determinar a ação da AMI no modelo de reversão do edema de pata induzido pelo dextrano, segundo método descrito a seguir.

Antes de aplicar o agente edematogênico todas as patas direita traseira dos animais selecionados foram medidas em pletismógrafo acoplado a registrador, a seguir o dextrano 10% foi administrada por via intraplantar (0,05 mL) na pata medida. A AMI foi testada nas doses de 25 e 50 mg/Kg, administradas no volume de 10 mL/Kg, i.p. O volume da pata foi novamente medido após a 1ª hora de aplicação do dextrano e imediatamente foi aplicada a AMI. E em seguida as patas foram medidas de 30 em 30 minutos, sendo a 1ª leitura da pata 60 min após a indução do edema e a 2ª leitura 90 min após a indução do edema e 30 min após a administração da AMI e assim sucessivamente nos tempos 120, 150, 180 e 210 min após a administração do dextrano. O volume da pata foi determinado pelo cálculo da diferença entre o volume da pata medido nesses intervalos de tempo e o seu volume determinado antes da injeção de dextrano. Como controle positivo utilizamos um grupo com ciproheptadina 5 mg/Kg, i.p. O grupo controle recebeu solução de Tween 80 a 0,5% no volume de 10 mL/Kg, i.p. e v.o., respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.5.1.

4.7 Avaliação do efeito sinérgico entre a Talidomida e AMI no edema de pata em ratos induzidos por carragenina.

Ratos Wistar, machos (150 – 200 g) divididos em grupos de 5 animais cada, foram utilizados para avaliar o efeito sinérgico entre a AMI e Talidomida no modelo de edema de pata induzido por carragenina, segundo o método de Winter e cols., (1962), conforme descrito anteriormente.

Com a Talidomida foi utilizada duas doses, uma maior de 5 mg/Kg, i.p., onde houvesse uma boa resposta terapêutica e uma menor de 2 mg/Kg, i.p., onde a resposta terapêutica fosse pequena. Para a AMI as doses utilizadas como padrão foram de 5, 10 e 25 mg/Kg, por via intraperitoneal. As doses usadas quando associadas foram: AMI 5 mg/Kg, i.p. com Talidomida 2 mg/Kg, i.p. e AMI 10 mg/Kg, i.p. com Talidomida 5 mg/Kg, i.p., com intervalo de administração entre estas drogas de 15 minutos. Como controle foi administrado solução de Tween 80 a 0,5%, i.p., 30 minutos antes da injeção intraplantar de 0,1 mL da solução de carragenina 1% na pata traseira, direita do animal. Todas as doses foram aplicadas em um volume de 10 mL/Kg. O volume da pata foi medido antes e com 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a administração de carragenina e foi determinado pelo cálculo da diferença entre o volume da pata medido nesses intervalos de tempo e o seu volume determinado antes da injeção de carragenina. A análise estatística foi feita utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey – Kramer para comparações múltiplas.

4.8 Avaliação de efeitos comportamentais relacionados aos SNC pela AMI em camundongos

4.7.1- Avaliação da atividade exploratória

a) Teste do campo aberto na arena para camundongos:

Camundongos Swiss macho de 20 a 30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, foram utilizados para determinar a atividade da AMI a nível de SNC, conforme descrito abaixo.

Este teste foi feito em uma caixa de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividido em 9 quadrantes iguais, sendo utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal, como mostra a **Figura 9**, (Archer, 1973). Os principais parâmetros para observação foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de autolimpeza *grooming*, número de levantamentos *rearing*, registrados durante um tempo de 3 minutos, após 1 minuto de habituação. O Teste foi realizado 1 hora após o tratamento com a droga em estudo, no caso a AMI nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/Kg, i.p., utilizando-se a solução de Tween 80 0,5% como controle e diazepam 1 mg/Kg, i.p. como controle positivo. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet para comparações múltiplas.

b) Teste do Labirinto em Cruz Elevado ou Plus Maze

Um dos métodos para medir a ansiedade mais utilizado e aceito pela comunidade científica é o labirinto em cruz elevado (Treit, 1985; Anseloni, 1995; Rodgers, 1997; Zangrossi Jr., 1997). Este modelo consiste na utilização de um aparelho composto de dois braços adjacentes abertos e outros dois fechados, conectados por uma plataforma central de 10 cm x 10 cm e dispostos a 50 cm do solo. Os braços abertos apresentam medidas de 50 cm x 10 cm x 40 cm, medidas estas relacionadas

respectivamente ao comprimento, largura e altura (**Figura 9**). Neste modelo, os roedores evitam os braços abertos do labirinto, restringindo a maioria de suas atividades aos braços fechados. Uma atividade relativamente baixa nos braços aberta é indicativa de ansiedade. Em contrapartida, roedores submetidos ao tratamento com ansiolíticos cruzam mais vezes pelos braços abertos e permanecem mais tempo nestes braços quando comparados aos animais controles (Zangrossi Jr., 1997).

Uma hora após a administração da droga cada animal foi colocado na plataforma central do labirinto em cruz elevado, com o focinho direcionado para um dos braços fechados. Durante 5 minutos foi avaliado o número de entradas nos braços aberto e fechados, além do tempo de permanência nos respectivos braços. Todo teste foi realizado em uma sala fechada, com temperatura e umidade controlada (23 ± 1 °C), iluminação de pouca intensidade (lâmpada vermelha de 15 W) e ruídos atenuados.

A AMI foi usada nas concentrações de 10, 25 e 50 mg/Kg, Tween 80 a 0,5% como controle e Diazepam 1 mg/Kg como controle positivo, todos foram administrados por via intraperitoneal no volume de 10 mL/kg. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet para comparações múltiplas.



Figura 9 - Fotografias do labirinto em cruz elevado e do campo aberto, instrumentos utilizados para a avaliação da ansiedade experimental em rato e camundongos.

4.7.2 Avaliação da coordenação motora

a) Teste do Rota Rod

Camundongos Swiss macho de 20 a 30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, foram utilizados para determinar a atividade da AMI a nível de SNC, conforme descrito abaixo.

Para avaliar a coordenação motora dos animais após a administração da AMI foi utilizado o teste do “rota rod”, onde os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevado a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm. Os animais foram selecionados em sessões de 1 min de duração, antes da administração das drogas ou veículo (controle), sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória por este período. Os animais selecionados receberam o tratamento, no dia do teste e são colocados no “rota rod”, por 1 min. Foi registrado o tempo de permanência na barra giratória (em segundos) e o número de quedas, com três reconduções, no máximo (Dunham & Myia, 1957). Este teste permite avaliar se os tratamentos promovem incordenação motora nos animais por sedação e/ou relaxamento muscular. As doses de 10, 25 e 50 mg/Kg, i.p. de AMI foram administradas 1 hora antes de iniciar o experimento, Tween 80 a 0,5% foi utilizada como controle e o Diazepam 1mg/Kg, i.p. foi utilizado como controle positivo no volume de 10 mL/kg. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet para comparações múltiplas.

4.9 Determinação da atividade inibitória da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI) sobre a agregação de plaquetas humanas *in vitro*

4.9.1 Colheita do sangue

O sangue para a realização deste estudo foi obtido de indivíduos aparentemente normais e saudáveis, não fumantes, que relataram não estar fazendo uso de medicamentos

por pelo menos duas semanas anteriores a colheita, sendo estes alunos e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Também foi utilizado uma mistura (pool) de sangue de várias pessoas, seguindo os mesmos critérios acima, de pacientes do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Walter Cantídio da UFC. As amostras de sangue foram colhidas da veia antecubital, por punção utilizando o sistema *Vacutainer BD* com tubos contendo citrato trissódico diidratado 3,8% (9:1, v/v), como anticoagulante e centrifugados. Os testes adequados para esse estudo foram realizados sempre, em um período de até 3 h após a colheita da amostra.

4.9.2 Obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP)

Inicialmente, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi separado após a centrifugação da amostra de sangue (2 vezes) a 1000 rpm, por 6 minutos, à temperatura ambiente. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi, em seguida, separado, após a centrifugação do restante da amostra a 3000 rpm, por 15 minutos, à temperatura ambiente.

4.9.3 Teste de agregação plaquetária em PRP

Os testes de agregação plaquetária foram realizados segundo o método turbidimétrico descrito por Born e Cross (1963), utilizando o agregômetro e registrador acoplado. Em uma cubeta de vidro do agregômetro, o fenômeno é induzido pela adição de um agente agregante ao PRP (ADP, colágen e ácido araquidônico), o qual é mantido a uma temperatura constante de 37 °C, sob agitação contínua a 1200 rpm. A turvação do PRP, devido a presença de plaquetas em suspensão, diminui quando ocorre a agregação. Pela passagem de um feixe de luz através do PRP há um aumento na transmitância, cuja medida é feita espectrofotometricamente e registrada na forma de uma curva que expressa a velocidade e quantidade de agregação.

4.9.4 Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP

A ação inibitória da alfa e beta amirina sobre a agregação plaquetária foi determinada frente aos agonistas ADP, colágeno e ácido araquidônico.

Foram utilizadas amostras de sangue que resultaram em 4 a 12 experimentos para cada agonista testado (ADP, colágeno e ácido araquidônico). A colheita do sangue (amostra de 20 mL de cada doador ou “pool”) e a preparação do PRP foram realizados conforme descrito em 4.8.1 e 4.8.2 respectivamente.

A AMI foi testada nas concentrações que variam de 25, 50, 100, 150 a 200 $\mu\text{g/mL}$. A curva de agregação plaquetária, para cada concentração de AMI, foi obtida transferindo-se uma alíquota de 450 μL de PRP juntamente com a solução da AMI para uma cubeta do agregômetro. Após a incubação dessa mistura por 10 minutos a 37 °C o agonista foi acrescentado. A curva de agregação do agonista (controle) foi obtida como descrito acima, exceto que neste caso o PRP foi incubado com Tween 80 a 0,5% (veículo de dissolução da AMI). As curvas relativas as diferentes concentrações de AMI foram obtidas entre curvas (controle) do agonista. A altura de cada curva, da linha de base onde teve início até o seu ponto máximo de agregação, foi medido em centímetros, com o auxílio de uma régua. A inibição da agregação plaquetária foi observada por comparação de altura de cada uma das curvas referentes as diferentes concentrações da AMI com o valor médio da altura da curva do agonista (controle), em duplicata.

A solução de ADP foi utilizada na concentração final de 3 μM no meio de reação para obter a curva de agregação expressa em 2 fases, ou seja, na forma de uma onda dupla. As soluções de colágeno e ácido araquidônico foram empregadas nas concentrações finais de 10 μM e 150 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente no meio de reação, para obter curvas de agregação plaquetária que representam 90 % da resposta máxima

A análise estatística foi realizada, submetendo-se os dados obtidos a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey – Kramer para

comparações múltiplas. Para isso foi empregado o programa de computador, GraphPad InStat (1993).

4.9.5 Avaliação da influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela AMI.

A influência do tempo de incubação da AMI com o PRP, sobre a inibição plaquetária, foi avaliada frente ao ADP, utilizando-se amostras de sangue de 6 indivíduos. A colheita do sangue (amostra de 20 mL de cada voluntário ou “pool”) e a preparação do PRP foram realizados conforme descrito em 4.8.1 e 4.8.2 respectivamente. Para cada amostra, AMI foi testada na concentração de 100 μM com períodos de incubação de 10, 15, 20 e 30 minutos. As curvas de agregação do agonista (controle) e na presença de AMI, observando os períodos crescentes de tempo de incubação foram obtidas como especificado em 4.8.4.

4.9.6 Determinação da potencialização pela AMI da ação inibitória do ácido acetilsalicílico sobre a agregação plaquetária

A potencialização pela AMI da atividade inibitória do ácido acetilsalicílico sobre a agregação plaquetária foi determinada em PRP proveniente de um “pool” ou de um PRP obtido de somente um indivíduo para cada agonista, obtido conforme descrito em 4.8.1 e 4.8.2

Primeiramente, foi determinada a curva (concentração-resposta) de inibição da agregação plaquetária pelo ácido acetilsalicílico. Nos experimentos subsequentes foi usada a concentração de ácido acetilsalicílico 25 μM que causou em média 10% do seu efeito máximo. Do mesmo modo que o ácido acetilsalicílico, a AMI foi empregada na concentração de 50 μM utilizando-se ADP 3 μM , colágeno 10 μM e ácido araquidônico 150 $\mu\text{g/mL}$ como agonista para produzir o menor efeito inibitório sobre a agregação plaquetária.

A curva de agregação de AMI na presença de ácido acetilsalicílico foi obtida transferindo-se para uma cubeta do agregômetro 450 μ L de PRP e ácido acetilsalicílico 25 μ M. Após a incubação dessa mistura a 37°C por 10min, AMI foi acrescentada e a incubação foi mantida por mais 10 min, antes da adição do agonista. A curva de agregação do controle foi obtida como descrito anteriormente, exceto que nesse caso o PRP foi incubado com o veículo de dissolução do ácido acetilsalicílico (solução de bicarbonato de sódio 0,1 M) nos primeiros 10 minutos. Em seguida o veículo de dissolução da AMI (Tween 80 à 0,5% em água destilada) foi acrescentado e a incubação foi mantida por mais 10 min, antes da adição do agonista. Curvas de agregação foram também obtidas por incubação de PRP apenas com o ácido acetilsalicílico 25 μ M ou AMI 50 μ M por 10 min a 37 °C, antes da adição do agonista. As curvas referentes ao ácido acetilsalicílico, AMI e AMI na presença de ácido acetilsalicílico foram obtidas entre as curvas do agonista (controle). Para análise estatística, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey – Kramer para comparações múltiplas.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da atividade antinociceptiva da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI)

5.1.1 Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos

A ação antinociceptiva da AMI, no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, foi determinada conforme descrito em 4.4.1.

A **Tabela 1** mostra os valores (média \pm E.P.M.) do número de contorções manifestadas pelos animais, referentes aos grupos controle e tratados com AMI nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg, v.o. e também nas doses de 5, 10 e 50 mg/Kg, i.p. Os valores de inibição, expressos em percentagem, em relação ao controle, relativos a cada uma das doses de AMI testadas, são também apresentados.

AMI nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg, v.o., mostrou efeitos antinociceptivos de modo dose-dependente, os efeitos significantes foram detectados nas três doses testadas, com inibições de 27, 38 e 54 %, respectivamente. AMI foi mais ativa quando administrada por via intraperitoneal, as doses de 10 e 50 mg/Kg, i.p. causaram inibições significantes da ordem de 73 e 94 %, respectivamente. Dados da **Tabela 1** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 10**).

Tabela 1. Efeito da alfa e beta amirina (AMI) nas contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6 %, em camundongos.

Grupo	Nº de Contorções	Inibição(%)
Controle, v.o. (14)	39,4 ± 1,12	---
AMI 10 mg/Kg, v.o. (8)	28,8 ± 2,51	27*
AMI 50 mg/Kg, v.o. (8)	24,4 ± 3,81	38*
AMI 100 mg/Kg, v.o. (7)	18,1 ± 2,38	54 *
Controle, i.p. (9)	40,3 ± 2,30	---
AMI 5 mg/Kg, i.p. (6)	29,7 ± 2,98	26
AMI 10 mg/Kg, i.p. (8)	10,7 ± 1,83	73 *
AMI 50 mg/Kg, i.p. (8)	2,3 ± 0,84	94 *

Experimento realizado conforme materiais e métodos. Valores são Média ± E.P.M. do número de animais especificado em parêntese. *p<0,05 comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

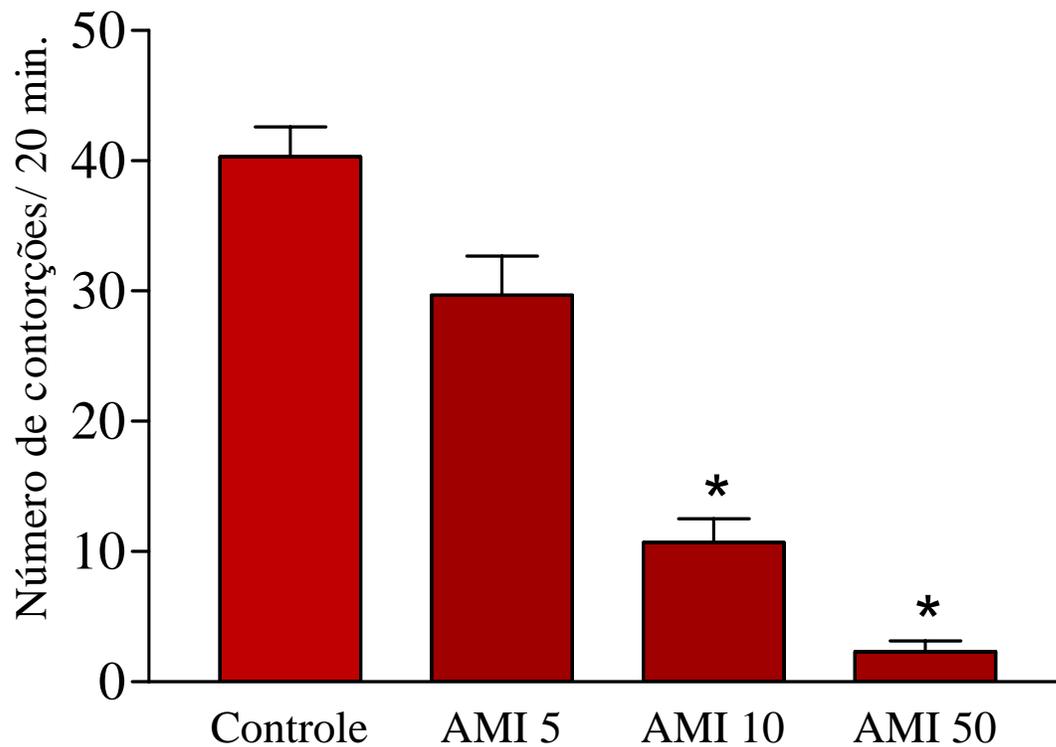


Figura 10 - Efeito da AMI (mg/Kg) no teste de contorção abdominal com ácido acético, em camundongos, administrada por via intraperitoneal. Inibição significativa de 94 % foi observada na dose de 50 mg/Kg. Neste gráfico os dados foram extraídos da Tabela 1. * $p < 0,05$ comparado ao controle (Anova e Tukey como teste *post hoc*)

5.1.2 Teste da formalina

O efeito inibitório da AMI, sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos, foi determinado segundo o protocolo descrito em 4.4.2.

A **Tabela 2** mostra os valores (média \pm E.P.M.) do tempo gasto em segundos, pelo animal lambendo a pata, nas fases inicial (1^a fase) e tardia (2^a fase) após a injeção de formalina, referentes aos grupos controle e tratados com AMI nas doses 5, 10 e 50 mg/Kg, v.o. e também nas doses de 10 e 50 mg/Kg, i.p. Os valores de inibição, expressos em percentagem em relação ao controle, relativos a cada uma das doses de AMI são também apresentados.

A análise estatística dos dados revelou que AMI, nas doses de 10 e 50 mg/Kg, v.o. e 10 e 50 mg/Kg, i.p. causou inibição significativa do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, tanto na fase inicial como também na fase tardia do teste, em relação ao grupo controle. Os valores de inibição foram 32 e 47 % na primeira fase e na segunda fase 59 e 72 % depois da administração oral da AMI (10 e 50 mg/Kg). De modo significativo em relação ao controle, a inibição produzida por AMI administrada intraperitoneal ocorreu em ambas as fases (primeira fase, 10 mg/Kg: 37 %; 50 mg/Kg: 51 %; e na segunda fase, 10 mg/Kg: 60 %; 50 mg/Kg: 73 %), ($p < 0,05$. ANOVA, e o teste de Tukey como *post hoc*).

O envolvimento do sistema opióide, no efeito de AMI sobre a nocicepção induzida por formalina, foi investigado conforme descrito em 4.4.2. A **Tabela 2** mostra também os valores (média \pm E.P.M.) do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, nas fases inicial e tardia, após a injeção de formalina, referentes aos grupos controle e tratados com AMI 10 mg/Kg, i.p.; morfina 10 mg/Kg, i.p.; naloxona 5 mg/Kg, s.c. + morfina 10 mg/Kg, i.p. e naloxona 5 mg/Kg, s.c. + AMI 10 mg/Kg, i.p. Os valores de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, relativos a AMI e a morfina são também apresentados.

A análise estatística dos dados revelou que AMI causou inibição significativa do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, tanto na fase inicial como na fase tardia do

teste (37 e 60 %, respectivamente), em relação ao grupo controle. De modo significativo em relação ao controle, a inibição produzida pela morfina, ocorreu em ambas as fases, tendo como valores de inibição 52 e 58 %, respectivamente. O antagonista opióide naloxona reverteu totalmente o efeito antinociceptivo da morfina, mas não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da AMI neste teste.

Os dados da **Tabela 2** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 11**).

Tabela 2. Efeito da alfa e beta amirina (AMI) no teste de formalina 1 %, em camundongos.

Grupo	Tempo de lambedura (s)		% Inibição	
	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
Controle, v.o. (10)	63,9 ± 2,81	22,1 ± 2,05	---	---
AMI 5 mg/Kg, v.o. (6)	52,5 ± 4,04	32,7 ± 4,24	---	---
AMI 10 mg/Kg, v.o. (6)	43,3 ± 6,16*	9,0 ± 2,24*	32	59
AMI 50 mg/Kg, v.o. (6)	34,0 ± 2,44*	6,3 ± 1,83*	47	72
Controle, i.p. (12)	71,7 ± 1,76	31,9 ± 1,50	---	---
AMI 10 mg/Kg, i.p.(12)	45,3 ± 1,70*	12,8 ± 1,87*	37	60
AMI 50 mg/Kg, i.p. (8)	35,5 ± 2,44*	8,7 ± 1,69*	51	73
Morfina 10 mg/Kg, i.p. (10)	34,6 ± 2,49*	13,3 ± 2,05*	52	58
Nal + Mor (12)	65,9 ± 1,99	35,2 ± 2,71	---	---
Nal 5, s.c. + AMI 10, i.p. (8)	50,4 ± 5,58*	11,9 ± 2,29*	30	63

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Valores são Média ± E.P.M. do tempo de lambedura registrado por 5 min. (1ª fase) e 20 min (2ª fase) imediatamente e depois da injeção de formalina. Em parêntese o número de animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*). Nal = naloxona (5 mg/kg, s.c.) e Mor = morfina (10 mg/kg, i.p.).

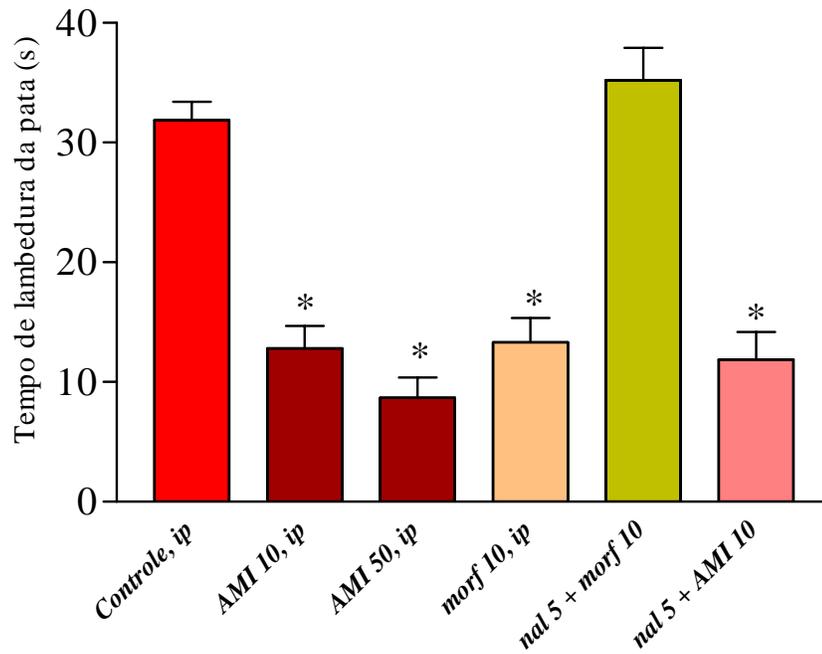


Figura 11 - Efeito da AMI (mg/Kg) no teste de formalina 1 % em camundongos administrado por via i.p. Neste gráfico os dados foram extraídos da Tabela 2 e mostram apenas a ação da AMI na *segunda fase* do teste onde as inibições foram maiores em relação a primeira fase. A interferência da AMI no sistema opióide foi avaliada, onde se observa que a naloxona não consegue reverter o efeito da AMI. * $p < 0,05$ comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*). Morf = morfina (mg/Kg, i.p.), nal = naloxona (mg/Kg, s.c.).

5.1.3 Teste da placa quente

A ação da AMI, no teste da placa quente, foi determinada segundo o protocolo descrito em 4.4.3. A **Tabela 3** mostra os valores (média \pm E.P.M.) do tempo decorrido desde o início do teste até o animal responder ao estímulo térmico, medido antes (T_0) e com 30, 60 e 90 minutos após o tratamento, referentes aos grupos controle e tratados com AMI nas doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg, v.o. e 10 e 50 mg/Kg, i.p. A análise estatística dos dados revelou que AMI na dose 50 mg/Kg, v.o., demonstrou efeito antinociceptivo apenas em T_{30} com 17% de inibição, ao passo que na dose de 100 mg/Kg, v.o. mostrou ter efeito no aumento de tempo à sensibilidade térmica nos tempos T_{30} , T_{60} e T_{90} com aumento de 47, 44 e 25 %, respectivamente. AMI administrada por via intraperitoneal demonstrou efeito somente na dose de 50 mg/Kg, com 62, 71 e 25 % de inibição em T_{30} , T_{60} e T_{90} , respectivamente.

O envolvimento do sistema opióide, no efeito de AMI sobre a nocicepção induzida por estímulo térmico, foi investigado conforme descrito em 4.4.3. A **Tabela 3** também mostra os valores (média \pm E.P.M.) do tempo de permanência do animal sobre o estímulo térmico, referentes aos grupos controle e tratados com AMI 50 mg/Kg, i.p.; morfina 10 mg/Kg, i.p.; naloxona 5 mg/Kg, s.c. + morfina 10 mg/Kg, i.p. e naloxona 5 mg/Kg, s.c. + AMI 50 mg/Kg, i.p. Os valores de inibição, expressos em percentagem em relação ao controle, relativos a AMI e a morfina são também apresentados. A análise estatística dos dados revelou que a morfina exerce efeito antinociceptivo significativo, o qual foi revertido pela naloxona, porém o efeito antinociceptivo da AMI não foi revertido pelo antagonista opióide naloxona.

Dados da **Tabela 3** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 12**).

Tabela 3. Efeito da alfa e beta amirina (AMI) no teste da placa quente em camundongos.

Grupo	T0	Latência ao estímulo térmico (s)		
		T30	T60	T90
Controle, v.o. (12)	15,00± 0,57	11,69± 0,31	11,39± 0,63	10,50± 0,66
AMI 50 mg/Kg, v.o. (10)	14,32± 0,53	13,70± 1,07* (17%)	10,62± 1,10	11,44± 1,45
AMI 100 mg/Kg, v.o. (10)	14,88± 0,91	17,16± 1,04* (47%)	16,40± 2,11* (44%)	13,14± 1,29 (25%)
Controle, i.p. (12)	13,42± 0,25	11,15± 0,46	11,19± 0,66	10,75± 0,43
AMI 10 mg/Kg, i.p. (10)	12,93± 0,88	12,06± 1,23	14,44± 1,10	10,61± 1,04
AMI 50 mg/Kg, i.p. (10)	14,35± 1,07	18,10± 1,20* (62%)	19,18± 1,58* (71%)	13,28± 1,20* (25%)
MOR 10 mg/Kg, i.p. (10)	14,87± 0,94	19,97± 1,58* (79%)	19,39± 1,89* (73%)	15,83± 1,73* (47%)
NAL 5 + MOR 10 (10)	12,89± 0,72	14,36± 1,67	13,14± 1,26	10,20± 0,91
NAL 5 + AMI 50 mg/Kg, i.p. (12)	12,79± 0,89	16,33± 0,80* (46%)	16,80± 1,32* (50%)	9,58± 1,66

Experimento realizado como descrito em materiais e métodos. Valores são Média ± E.P.M. do número de animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*). Entre parênteses e abaixo das médias estão indicados os percentuais de aumento do tempo de latência. MOR = morfina (10 mg/kg, i.p.); NAL = naloxona (5 mg/kg, s.c.).

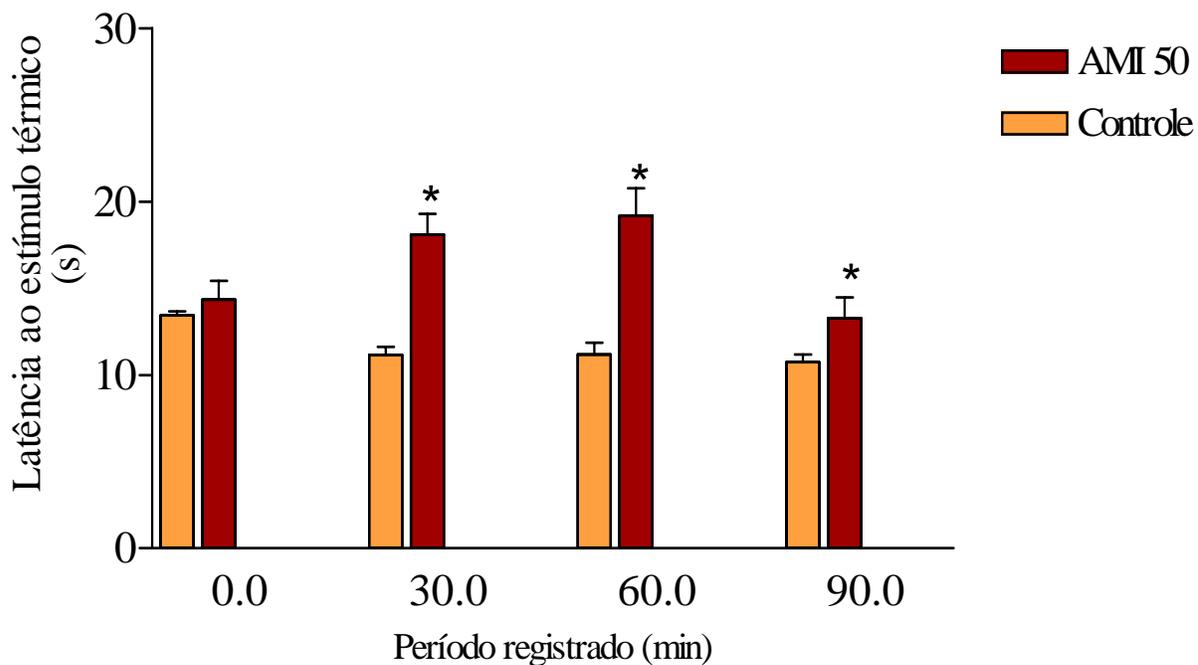


Figura 12 – Efeito da AMI no Teste da Placa Quente em camundongos. Neste gráfico é demonstrado o efeito da AMI 50 mg/Kg, i.p., aumentando significativamente o tempo de permanência na placa quente, nos tempos 30 e 60 min (62 e 71 % em relação ao controle). Os dados foram extraídos da tabela 3. * $p < 0,05$ comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

5.2 Determinação da atividade antiedematogênica da mistura isomérica de alfa e beta amirina

5.2.1 Modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongo

A ação da AMI, sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos, foi determinada conforme descrito em 4.5.1.

A **Tabela 4** mostra os valores (média \pm E.P.M.) do volume do edema de pata (mL) medido 1, 2, 3 e 4 horas após a administração de carragenina, referentes aos grupos controle e tratados com AMI nas doses de 50 e 100 mg/Kg, v.o. e também nas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg, i.p. Indometacina na dose de 10 mg/Kg, v.o. foi utilizada como controle positivo. A análise estatística dos dados revelou que AMI na dose de 50 mg/Kg, v.o. não reduziu significativamente o edema de pata, ao passo que na dose de 100 mg/Kg, v.o. houve inibição significativa na 2^a, 3^a e 4^a (56, 68 e 39 %, respectivamente). Os resultados demonstraram também que AMI 10 mg/Kg, i.p. causou inibição significativa do edema somente na 3^a hora (39 %), na dose de 25 mg/Kg, i.p. as inibições ocorreram na 2^a, 3^a e 4^a hora (36, 42 e 38 % respectivamente) e na dose de 50 mg/Kg, i.p. as inibições ocorreram na 1^a, 2^a, 3^a e 4^a hora (43, 36, 53 e 41 %, respectivamente), em relação ao grupo controle.

Dados da **Tabela 4** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 13**).

Tabela 4. Efeito da alfa e beta amirina (AMI) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.

Grupo	volume da pata (mL)			
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Controle, v.o. (8)	0,15 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,31 ± 0,02
AMI 50 mg/Kg, v.o.(8)	0,11 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,25 ± 0,01
AMI 100 mg/Kg, v.o.(8)	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,03* (56%)	0,13 ± 0,03* (68%)	0,19 ± 0,01* (39%)
IND 10 mg/Kg, v.o.(8)	0,17 ± 0,02	0,23 ± 0,02* (32%)	0,22 ± 0,02* (45%)	0,23 ± 0,02* (26%)
Controle, i.p. (8)	0,23 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,34 ± 0,02
AMI 10 mg/Kg, i.p.(8)	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01* (39%)	0,26 ± 0,01
AMI 25 mg/Kg, i.p.(8)	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,02* (36%)	0,21 ± 0,01* (42%)	0,21 ± 0,02* (38%)
AMI 50 mg/Kg, i.p.(8)	0,13 ± 0,01* (43%)	0,18 ± 0,02* (36%)	0,17 ± 0,01* (53%)	0,20 ± 0,02* (41%)

Experimento realizado como descrito em materiais e métodos. Valores são Média ± E.P.M. do número de animais em parêntesis. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*). Entre parêntese, abaixo das médias estão indicados os percentuais de inibição. IND = Indometacina.

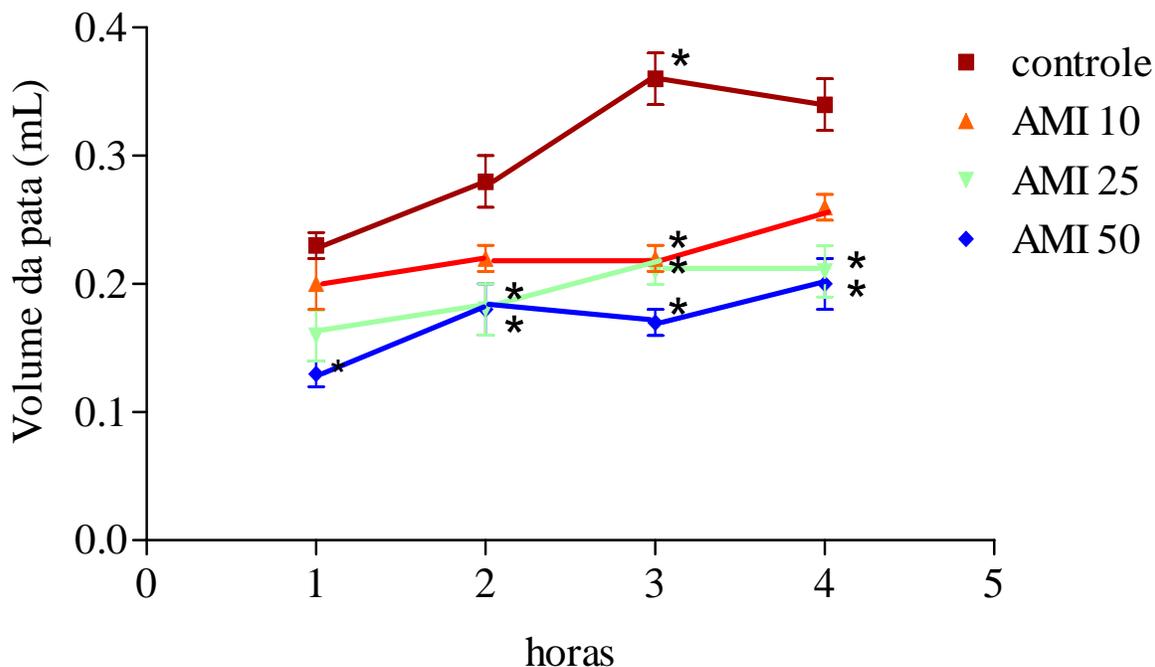


Figura 13 - Efeitos da AMI (i.p.) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Houve inibição significativa em AMI 10, na 3^a h (39 % de inibição), em AMI 25 as inibições foram na 2^a, 3^a e 4^a h (36, 42 e 38 %, respectivamente) e em AMI 50 as inibições foram na 1^a, 2^a, 3^a e 4^a h (43, 36, 53 e 41%, respectivamente), em relação ao controle. O efeito antiedematogênico da AMI (mg/Kg, i.p.) manifesta-se do tipo dose-dependente. Os dados foram extraídos da tabela 4. ($p < 0,05$, ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

5.2.2 Determinação da potencialização do efeito antiedematogênico da AMI pela indometacina no modelo do edema de pata induzido por carragenina em camundongos

A avaliação da potencialização do efeito antiedematogênico da AMI pela indometacina foi determinado conforme descrito em 4.5.2. A **Tabela 5** mostra os valores (média \pm E.P.M.) dos volumes das patas (mL) medidos com 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de carragenina, referentes aos grupos controle e tratados com indometacina (IND) nas doses de 2 mg/Kg e 10 mg/Kg, v.o.; AMI na dose de 5 mg/Kg, i.p. e um último grupo associando a AMI 5 mg/Kg, i.p. com a dose mais baixa de IND (2 mg/Kg, v.o.).

A análise estatística dos dados revelou que a associação de IND com AMI, na dose supracitada causou redução do edema de pata em relação ao grupo controle na 2^a, 3^a e 4^a hora da ordem de 25 %, enquanto que a AMI e a IND em doses baixas e sozinhas não causaram diminuição significativa do edema. A dose de 10 mg/Kg de IND serviu como controle positivo para o experimento. Quando comparado os grupos entre si não houve diferença significativa entre os mesmos. Dados da **Tabela 5** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 14**).

Tabela 5. Avaliação do efeito sinérgico entre a AMI e IND no edema de pata em camundongos induzido por carragenina.

Grupo	volume da pata (mL)			
	1 ^a h	2 ^a h	3 ^a h	4 ^a h
Controle, i.p. (08)	0,28 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,31 ± 0,02
IND 10 mg/Kg, v.o. (06)	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,02* (28%)	0,22 ± 0,02* (29%)	0,23 ± 0,02* (26%)
IND 2 mg/Kg, v.o. (06)	0,24 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01
AMI 5 mg/Kg, i.p. (08)	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,26 ± 0,02
IND 2 mg/Kg, v.o. + AMI 5 mg/Kg, i.p. (06)	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01* (25%)	0,23 ± 0,01* (26%)	0,23 ± 0,01* (26%)

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Os valores são a Média ± E.P.M. O número de animais por grupo é descrito entre parêntesis na coluna do grupo e abaixo da média entre parêntesis está indicando o percentual de inibição do edema. Em asterisco os valores que foram significativos com $p < 0,05$ em relação ao controle do mesmo período de tempo (ANOVA; Tukey como teste *post hoc*). IND=Indometacina.

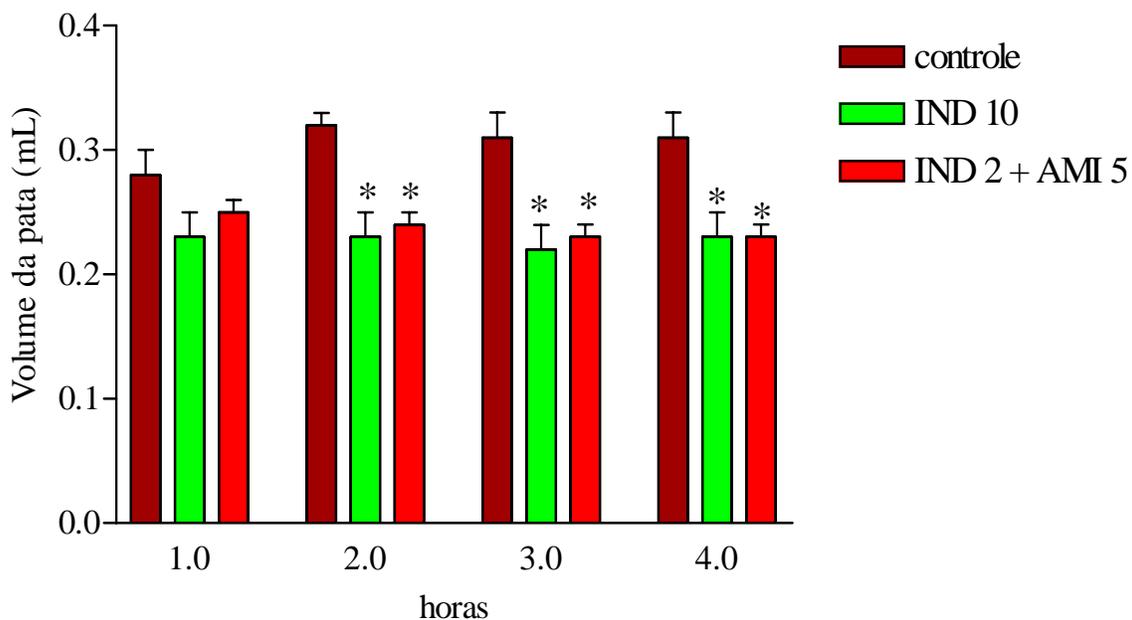


Figura 14 - Avaliação do efeito sinérgico entre a AMI e IND no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. A associação de AMI (5 mg/Kg) e IND (2 mg/Kg) causa efeito semelhante àquele observado com IND na dose de 10 mg/Kg na 2^a, 3^a e 4^a hora, após a administração da carragenina. Os dados deste gráfico foram extraídos da Tabela 5. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*). IND = Indometacina.

5.2.3 Modelo de edema de pata induzido por dextrano em camundongo

A ação da AMI sobre o edema de pata induzido por dextrano em camundongos foi determinada conforme descrito em 4.5.3. A **Tabela 6** mostra os valores (média \pm E.P.M.) do volume de pata (mL) medido com 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de dextrano, referentes aos grupos controle e tratados com AMI nas doses de 10, 50 e 100 mg/Kg, v.o. e 5, 10 e 25 mg/Kg, i.p.

A análise estatística dos dados revelou que AMI, quando administrado por via oral na dose de 50 mg/Kg causou redução do edema de pata em relação ao grupo controle na 2^a, 3^a e 4^a hora (42, 50 e 44 %, respectivamente), enquanto que na dose de 100 mg/Kg a redução do edema foi de 42, 60 e 44 % na 2^a, 3^a e 4^a hora, respectivamente. A dose de 10 mg/Kg, v.o. não produziu efeito significativo. Quando a via de administração foi a intraperitoneal AMI na dose de 5 mg/Kg, causou inibição de 44 % na 2^a hora, na dose de 10 mg/Kg houve inibição na 2^a, 3^a e 4^a hora com 50, 60 e 50 % de inibição, respectivamente e a dose de 25 mg/Kg a inibição foi na 1^a, 2^a, 3^a e 4^a hora com 62, 63, 73 e 60 % de inibição, respectivamente. Dados da **Tabela 6** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 15**).

Tabela 6. Efeitos da alfa e beta amirina (AMI) no edema de pata induzido por dextrano em camundongos.

Grupo	1ª hora	volume da pata (mL)		
		2ª hora	3ª hora	4ª hora
Controle, v.o.(8)	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01
AMI 10 mg/Kg, v.o.(8)	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,02
AMI 50 mg/Kg, v.o.(8)	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01* (42%)	0,05 ± 0,01* (50%)	0,05 ± 0,01* (44%)
AMI 100 mg/Kg, v.o.(8)	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01* (42%)	0,04 ± 0,01* (60%)	0,05 ± 0,01* (44%)
CPD 5 mg/Kg, v.o.(8)	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01* (33%)	0,07 ± 0,01* (30%)	0,05 ± 0,01* (44%)
Controle, i.p.(8)	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,01
AMI 5 mg/Kg, i.p.(8)	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01* (44%)	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01
AMI 10 mg/Kg, i.p.(8)	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02* (50%)	0,06 ± 0,02* (60%)	0,05 ± 0,02* (50%)
AMI 25 mg/Kg, i.p. (8)	0,05 ± 0,01* (62%)	0,06 ± 0,05* (63%)	0,04 ± 0,01* (73%)	0,04 ± 0,01* (60%)

Experimento realizado como descrito em materiais e métodos. Valores são média ± EPM do número de animais em parêntesis. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*). Entre parêntese, abaixo das médias estão indicados os percentuais de inibição. CPD = Ciproheptadina.

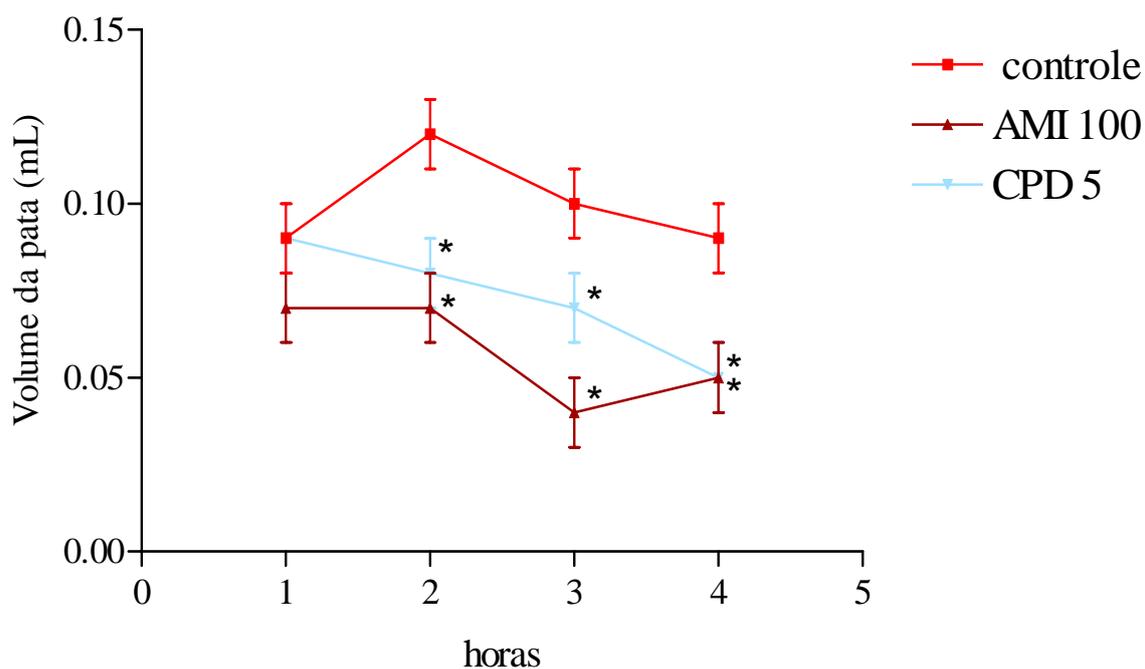


Figura 15 - Efeitos da AMI no edema de pata induzido por dextrano em camundongos. O efeito da AMI 100 mg/Kg, v.o. é comparado com o efeito da CPD (Ciproheptadina) na dose de 5 mg/Kg, v.o., onde tiveram inibições significantes na 2^a, 3^a e 4^a h. A AMI inibiu em 42, 60 e 44 % respectivamente e a CPD em 33, 30 e 44 %, respectivamente, nas horas referidas. Os dados foram extraídos da Tabela 6. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

5.3 Avaliação do efeito terapêutico (curativo) administrando a AMI após a formação do edema de pata

5.3.1 Reversão do edema inflamatório induzido pela carragenina

O efeito curativo da AMI, sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos, foi determinada conforme descrito em 4.5.4.

A **Tabela 7** mostra os valores (média \pm E.P.M.) do volume do edema de pata (mL) medido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 e 48 horas após a administração de carragenina, referentes aos grupos controle e tratados com AMI nas doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg, v.o. e também nas doses de 25 e 50 mg/Kg, i.p. Indometacina na dose 10 mg/Kg, v.o. foi utilizada como controle positivo. A análise estatística dos dados revelou que AMI na dose de 100 mg/Kg, v.o. não reduz significativamente o edema de pata, com um pequeno efeito somente após a 24^a hora. Os resultados demonstraram também que AMI 25 mg/Kg, i.p. causou uma reversão significativa do edema na 4^a, 5^a e 6^a hora (25, 23 e 20 %, respectivamente), e na dose de 50 mg/Kg, i.p. a inibição se deu na 4^a, 5^a, 6^a e 24^a hora (30, 26, 20 e 27 % respectivamente), em relação ao grupo controle. A indometacina na dose de 10 mg/Kg utilizada como controle positivo causou reversão significativa do edema na 4^a, 5^a, 6^a e 24^a hora, em relação ao grupo controle. Dados da **Tabela 7** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 16**).

Tabela 7. Reversão pela AMI do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos (Efeito Curativo).

Grupo	Volume da pata (mL)							
	1h	2h	3h	4h	5h	6h	24h	48h
Controle, v.o.	0,11± 0,010	0,15±0,010	0,17±0,008	0,18± 0,006	0,17±0,006	0,20±0,005	0,12± 0,006	0,12±0,007
IND 10 mg/Kg, v.o.	0,12± 0,010	0,14± 0,008	0,14±0,009	0,14± 0,012*	0,13±0,012*	0,15±0,007*	0,07±0,008*	0,11±0,010
				(23%)	(22%)	(22%)	(38%)	
AMI 50 mg/Kg, v.o.	0,12± 0,012	0,15±0,007	0,16±0,009	0,17± 0,007	0,20±0,008	0,19±0,008	0,09±0,007	0,13±0,012
AMI 100 mg/Kg,vo	0,13± 0,009	0,15±0,015	0,16±0,011	0,17± 0,010	0,20±0,006	0,19± 0,007	0,08± 0,013*	0,11±0,010
							(35%)	
Controle, i.p.	0,09± 0,009	0,14±0,020	0,14±0,012	0,16± 0,010	0,16±0,010	0,16± 0,007	0,15± 0,009	0,13±0,012
AMI 25 mg/Kg, i.p.	0,09± 0,007	0,12± 0,011	0,14±0,008	0,12± 0,009*	0,12±0,008*	0,13± 0,006*	0,13±0,007	0,11±0,010
				(25%)	(23%)	(20%)		
AMI 50 mg/Kg, i.p.	0,09± 0,009	0,13± 0,009	0,12±0,012	0,11±0,011*	0,12±0,011*	0,13± 0,013*	0,11± 0,012*	0,11±0,008
				(30%)	(26%)	(20%)	(27%)	

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Os valores são a Média ± E.P.M. O número de animais foi de oito para cada grupo. Abaixo da média entre parêntesis está indicando o percentual de inibição do edema. Em asterisco os valores que foram significativos com $p < 0,05$ em relação ao controle do mesmo período de tempo (ANOVA; Tukey como teste *post hoc*). IND = indometacina.

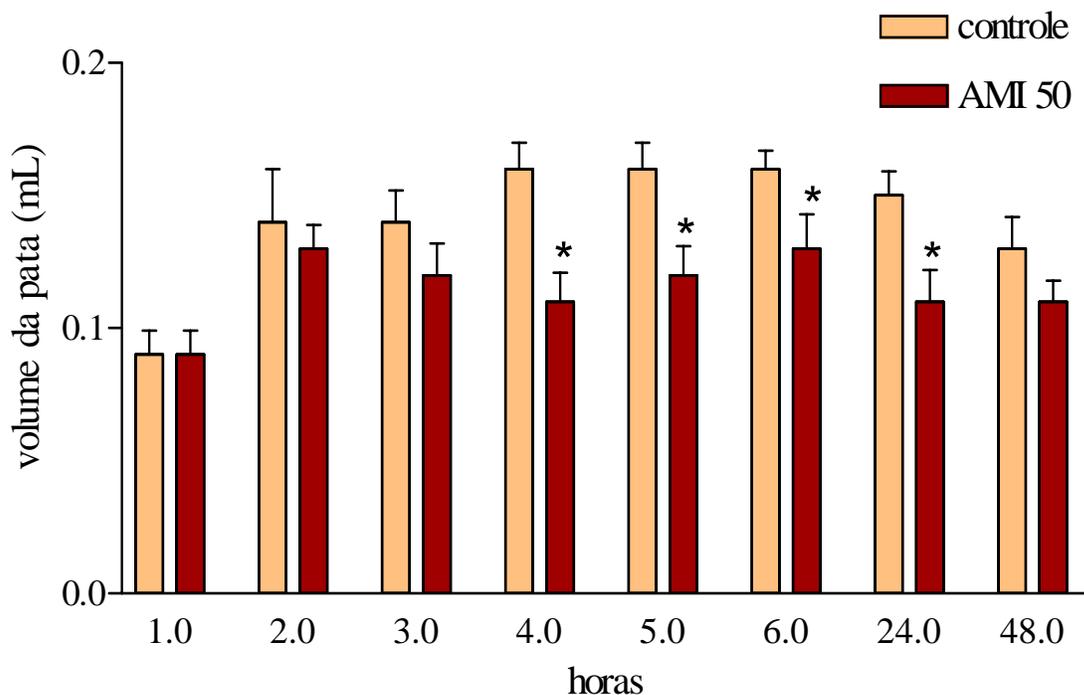


Figura 16 - Efeito Curativo. Reversão pela AMI do edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Ação terapêutica da AMI (50 mg/Kg, i.p.) para tratar um edema provocado pela carragenina, demonstrando uma atividade terapêutica significativa na 4^a, 5^a, 6^a e 24^a hora, conforme mostra o gráfico acima. Estes dados foram extraídos da tabela 7. * $p < 0,05$ em relação ao controle, ANOVA e Tukey como teste *post hoc*.

5.3.2 Reversão do edema inflamatório induzido pelo dextrano

O efeito curativo da AMI, sobre o edema de pata induzido por dextrano em camundongos, foi determinada conforme descrito em 4.5.4.

A **Tabela 8** mostra os valores (média \pm EPM) do volume do edema de pata (mL) medido 1 h; 1,5 h; 2 h; 2,5 h; 3 h e 3,5 h após a administração de dextrano, referentes aos grupos controle e tratados com AMI nas doses de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg, i.p. e ciproheptadina na dose 5 mg/Kg, i.p. que foi utilizada como controle positivo. A análise estatística dos dados revelou que AMI na dose de 25 mg/Kg, i.p. não reduz significativamente o edema de pata. Os resultados demonstraram também que AMI 50 mg/Kg, i.p. causou uma reversão significativa do edema após 2,5 h; 3 h e 3,5 h (37, 58 e 50 %, respectivamente), em relação ao grupo controle. A ciproheptadina na dose de 5 mg/Kg, i.p. utilizada como controle positivo causou reversão do edema após 2 h; 2,5 h; 3 h e 3,5 h (38, 30, 44 e 70 %, respectivamente) em relação ao grupo controle. Dados da **Tabela 8** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 17**).

Tabela 8. Reversão pela AMI do edema de pata induzido pelo dextrano em camundongos (Efeito Curativo)

Grupo	volume da pata (mL)					
	1h	1,5 h	2h	2,5 h	3 h	3,5 h
Controle, i.p. (8)	0,074±0,007	0,077±0,008	0,076±0,008	0,075±0,004	0,071± 0,008	0,067±0,012
AMI 25 mg/Kg, i.p.(8)	0,074± 0,007	0,080±0,009	0,065±0,001	0,065±0,005	0,063±0,009	0,047±0,008
AMI 50 mg/Kg, i.p. (8)	0,080±0,004	0,071±0,007	0,057±0,003	0,047±0,006* (37%)	0,030±0,003* (58%)	0,034±0,008* (50%)
CPD 5 mg/Kg, i.p. (8)	0,068±0,005	0,064±0,005	0,047±0,004* (38%)	0,053±0,004* (30%)	0,040±0,005* (44%)	0,020±0,006* (70%)

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Os valores são a Média ± E.P.M. O número de animais por grupo é descrito entre parêntesis na coluna do grupo e abaixo da média entre parêntesis está indicando o percentual de inibição do edema. Em asterisco os valores que foram significativos com $p < 0,05$ em relação ao controle do mesmo período de tempo (ANOVA; Tukey como teste *post hoc*). CPD = Ciproheptadina.

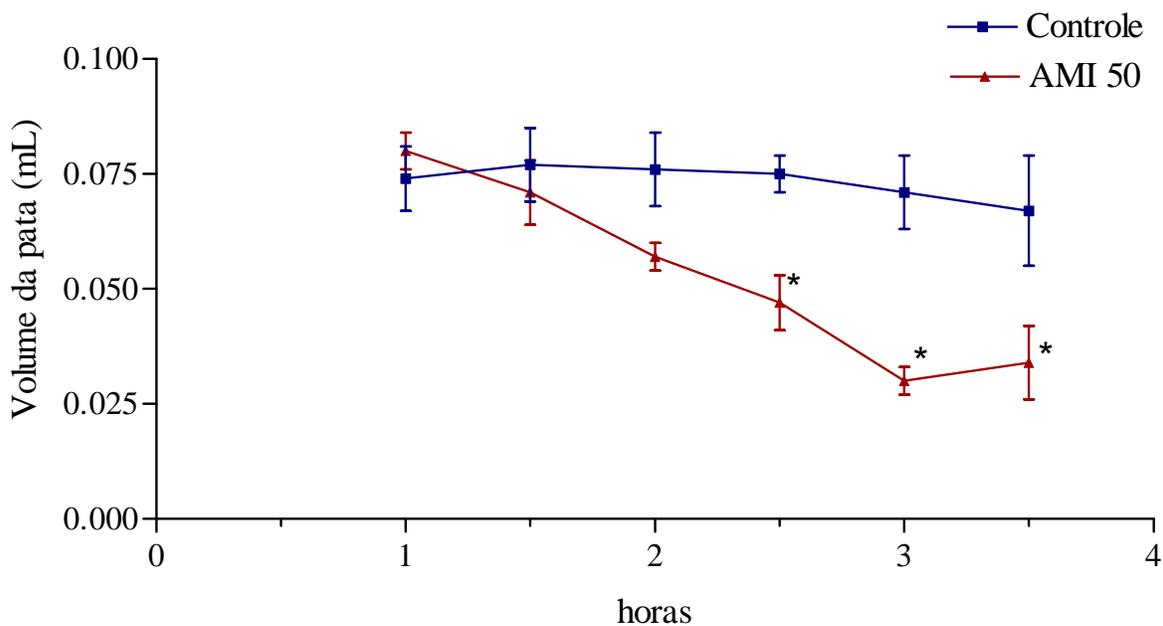


Figura 17 - Efeito Curativo. Reversão pela AMI do edema de pata induzido por dextrano em camundongos. Ação terapêutica da AMI (mg/Kg, i.p.) para tratar um edema de pata provocado por dextrano, demonstrando uma atividade terapêutica significativa nos tempos 2,5; 3 e 3,5 h onde teve inibição de 37, 58 e 50 %, respectivamente, conforme mostra o gráfico acima. Estes dados foram extraídos da Tabela 8. * $p < 0,05$ em relação ao controle, ANOVA e Tukey como teste *post hoc*.

5.4 Avaliação do efeito sinérgico entre a AMI pela Talidomida no edema de pata induzido por carragenina em ratos.

A avaliação da potencialização do efeito antiedematogênico da AMI pela Talidomida (TLD) foi determinado conforme descrito em 4.7. **A Tabela 9** mostra os valores (média \pm E.P.M.) dos volumes das patas (mL) medidos com 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a injeção de carragenina, referentes aos grupos controle e tratados com Talidomida nas doses de 2 mg/Kg e 5 mg/Kg, i.p.; AMI nas doses de 5, 10 e 25 mg/Kg, i.p. e os grupos associando a AMI 5 mg/Kg, i.p. com TLD 2 mg/Kg, i.p. e AMI 10 mg/Kg, i.p. com TLD 5 mg/Kg, i.p.

A análise estatística dos dados revelou que a associação de TLD 2mg/Kg com AMI 5 mg/Kg não causa reduções significantes quando comparado aos efeitos de cada uma das drogas isoladamente, entretanto TLD 5 mg/Kg com AMI 10 mg/Kg causou uma intensa redução do edema de pata quando comparada ao grupo controle, a AMI 10 mg/Kg e a TLD 5 mg/Kg, na 2^a, 3^a e 4^a hora com reduções percentuais de 26, 40 e 27 %, em relação a talidomida 5 mg/Kg que, dos três grupos os quais foi comparada, teve um melhor efeito .

Aplicado o teste estatístico ANOVA e Tukey como *post hoc*, que compara todos os grupos entre si, verificou-se que na 3^a hora a associação AMI 10 e TLD 5 foi estatisticamente diferente dos grupos controle, AMI 10 e TLD 5 no mesmo período tempo. Dados da **Tabela 9** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 18**).

Tabela 9. Avaliação do efeito sinérgico entre a AMI e TLD no edema de pata em ratos induzido por carragenina.

Grupo	volume da pata (mL)				
	1 ^a h	2 ^a h	3 ^a h	4 ^a h	24 ^a h
Controle, i.p. (5)	0,75 ± 0,04	1,39 ± 0,10	1,61 ± 0,07	1,51 ± 0,14	0,51 ± 0,04
TLD 2 mg/Kg, i.p. (5)	0,42 ± 0,02*	0,97 ± 0,10	1,23 ± 0,13	1,10 ± 0,12*	0,34 ± 0,08
TLD 5 mg/Kg, i.p. (5)	0,44 ± 0,04*	0,86 ± 0,08**	0,88 ± 0,03***	0,90 ± 0,02**	0,36 ± 0,08
AMI 5 mg/Kg, i.p. (5)	0,61 ± 0,04	1,09 ± 0,09	1,22 ± 0,13	1,21 ± 0,17	0,46 ± 0,11
AMI 10 mg/Kg, i.p. (5)	0,68 ± 0,08	1,08 ± 0,07	1,10 ± 0,07**	1,05 ± 0,06*	0,37 ± 0,08
AMI 25 mg/Kg, i.p. (5)	0,64 ± 0,09	0,90 ± 0,05**	0,96 ± 0,11***	1,06 ± 0,05*	0,24 ± 0,05*
TLD 2mg/Kg,ip + AMI 5mg/Kg,ip (5)	0,44 ± 0,03**	0,92 ± 0,02	1,13 ± 0,03*	1,21 ± 0,04	0,27 ± 0,02
TLD 5mg/Kg,ip + AMI 10mg/Kg,ip (5)	0,37 ± 0,05**	0,64 ± 0,10***	0,53 ± 0,10***	0,66 ± 0,09***	0,25 ± 0,01

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Os valores são a Média ± E.P.M. O número de animais por grupo é descrito entre parênteses. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle do mesmo período de tempo (ANOVA; Tukey como teste *post hoc*). TLD = Talidomida.

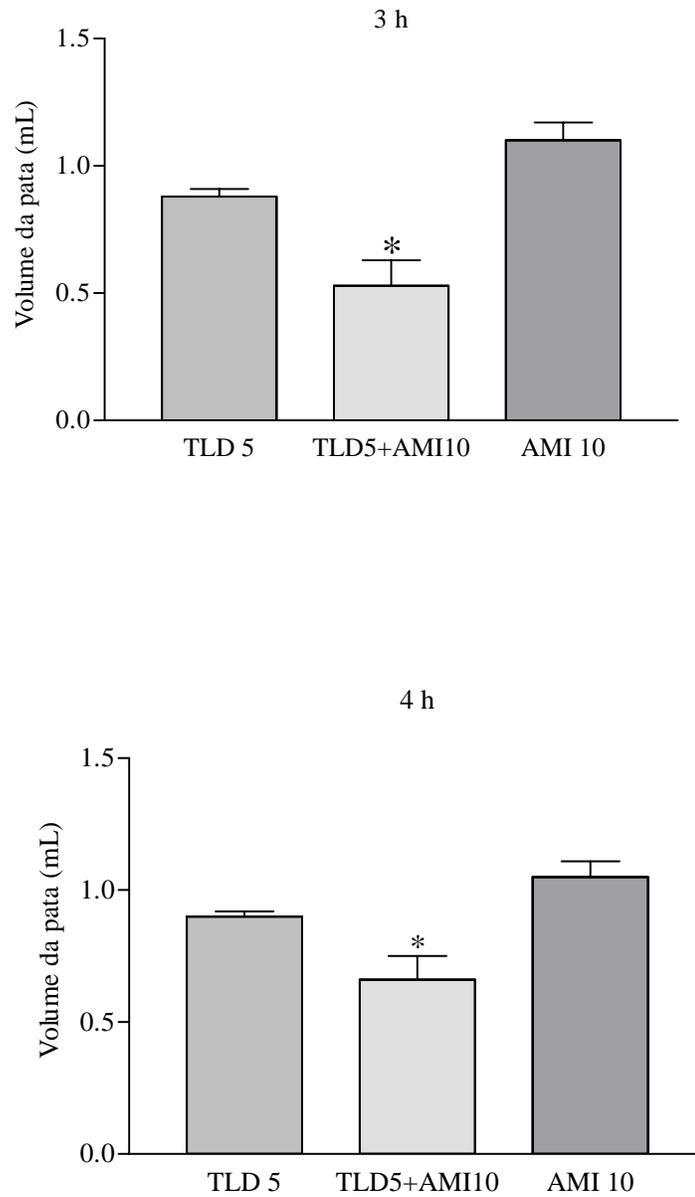


Figura 18 – Potencialização do efeito da AMI pela Talidomida no teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos. O efeito sinérgico entre a Talidomida e a AMI foi observado com a dose de 5 e 10 mg/Kg, i.p., respectivamente, com inibição no volume da pata dos ratos na 3^a hora e na 4^a hora (Figura 18), onde a formação do edema é mais intensa, após a administração da carragenina. Em * $p < 0,05$ onde todos os grupos foram comparados entre si, utilizando ANOVA e Tukey como *post hoc*.

5.5 Avaliação de efeitos comportamentais da AMI relacionados ao SNC, em camundongos

5.5.1 Avaliação da atividade exploratória

- Teste do campo aberto na arena para camundongos

A avaliação dos efeitos a nível de SNC provocados pela AMI foram revelados pela avaliação da atividade exploratória dos camundongos, seguindo procedimento descrito em 4.8.1. Os animais, divididos em número de 8 por grupo, tratados com AMI e controle foram analisados com relação aos seguintes comportamentos: Teste ME (Movimentação Espontânea), *Grooming* e *Rearing*.

Os resultados da **Tabela 10** mostraram que após o tratamento com a AMI ocorreu uma diminuição do tipo dose-dependente no Teste de Movimentação Espontânea, com inibições de 19, 26 e 33 % para AMI 10, 25 e 50 mg/Kg, i.p., respectivamente.

Também o *grooming* foi diminuído significativamente, 31, 40 e 46 %, respectivamente para as doses supracitadas quando comparadas ao controle. Quanto ao *rearing* houve inibições de 40, 51 e 68 %, respectivamente para as mesmas doses citadas anteriormente. Dados da **Tabela 10** foram convertidos na **Figura 19**.

- Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*)

Na **Tabela 11** mostra os resultados do teste de labirinto em cruz elevado onde a AMI nas doses de 10 e 25 mg/Kg, i.p., não causou alterações significativas nos parâmetros observados. A dose de 50 mg/Kg, i.p., causou um aumento significativo no Número de Entradas nos Braços Abertos (NEBA) e no Tempo de Permanência nos Braços Abertos (TPBA) da ordem de 162 e 143 %, respectivamente. O Tempo de Permanência nos Braços Fechado (TPBF) também foi alterados nesta dose de AMI com uma redução de 25 %. O diazepam, utilizado como controle positivo, alterou significativamente todos os parâmetros analisados, aumentando o número e o tempo de permanência nos braços abertos e diminuindo o número e o tempo de permanência nos braços fechados. Dados da **Tabela 10** foram extraídos para elaboração da **Figura 19**.

Tabela 10. Efeito da administração da AMI em camundongos no teste do Campo Aberto.

Grupo	Nº de cruzamentos	Nº <i>Grooming</i>	Nº <i>Rearing</i>
Controle, i.p. (8)	51,6±2,3	34,0±2,5	6,3±0,6
Diazepam 1 mg/Kg, i.p. (8)	34,7±3,6* 33%	14,0±2,3* 59%	2,1±0,6* 67%
AMI 10 mg/Kg, i.p. (8)	41,9±1,4 19%	23,7±1,9* 31%	3,8±0,7 40%
AMI 25 mg/Kg, i.p. (8)	38,3±2,4* 26%	20,4±2,9* 40%	3,1±0,7* 51%
AMI 50 mg/Kg, i.p. (8)	34,4±2,2* 33%	18,4±2,2* 46%	2,0±0,5* 68%

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Valores são a média ± EPM do número de animais especificado em parêntese. Abaixo da média está assinalado percentual de inibição. *p<0,05 comparado ao controle (ANOVA e Dunnet como teste *post hoc*). ME = Movimento exploratório.

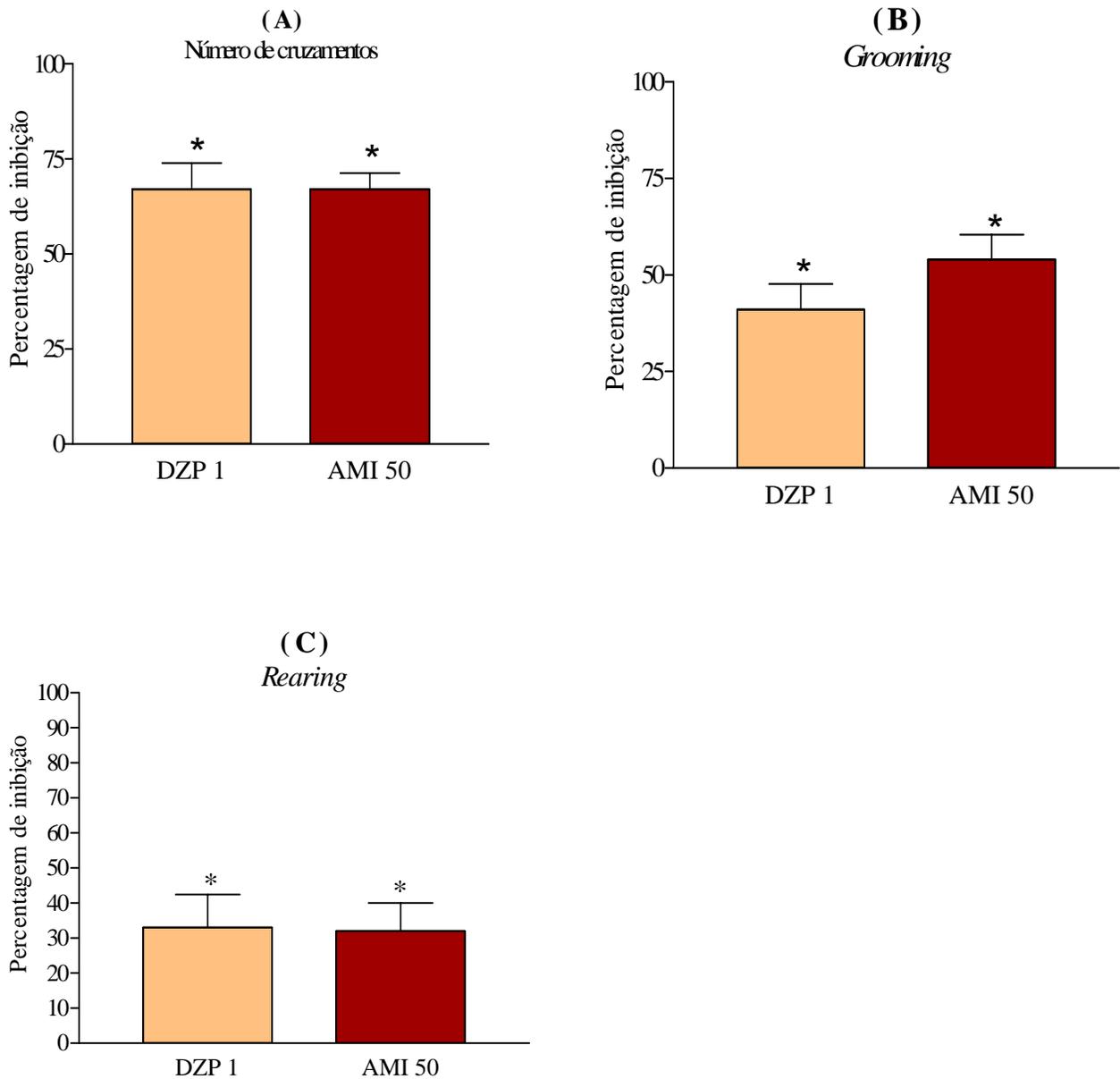


Figura 19 – Percentagem de inibição de efeitos comportamentais em nível de SNC provocado pela administração da AMI no teste do Campo Aberto em camundongos. Todos os parâmetros avaliados sofrem interferência após a administração da AMI 50 mg/Kg, i.p., que exibe um efeito semelhante ao Diazepam 1mg/Kg, i.p (DZP 1) As inibições foram de 33 % no movimento exploratório, 46 % no grooming e 68 % no rearing, comparado ao controle. Os dados foram extraídos da Tabela 10 onde foram convertidos em percentuais considerando o controle como 100 %. * $p < 0,05$ (ANOVA e Dunnet como *post hoc*).

Tabela 11. Efeitos da administração da AMI no teste do Labirinto em Cruz Elevado “Plus Maze” em camundongos.

Grupo	NEBA	TPBA(s)	NEBF	TPBF(s)
Controle, i.p. (8)	6,6±0,6	113,9±10,3	8,1±0,4	137,9±11,5
Diazepam 1mg/Kg, i.p. (8)	13,5±2,1*	201,5±12,0*	5,1±0,6*	72,8±10,2*
AMI 10 mg/Kg, i.p. (8)	7,3±0,5	139,0±5,2	7,1±0,6	119,0±4,5
AMI 25 mg/Kg, i.p. (8)	8,3±0,9	139,1±8,8	8,4±0,7	138,8±8,3
AMI 50 mg/Kg, i.p. (8)	10,8±0,8*	162,8±2,6*	7,0±0,6	104,1±4,6*

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Valores são a média ± EPM do número de animais especificado em parêntese. * $p < 0,05$ comparado ao controle (ANOVA e Dunnet como teste *post hoc*). NEBA = Número de entradas nos braços aberto; TPBA = Tempo de permanência nos braços aberto; NEBF = Número de entradas nos braços fechados e TPBF = Tempo de permanência nos braços fechado.

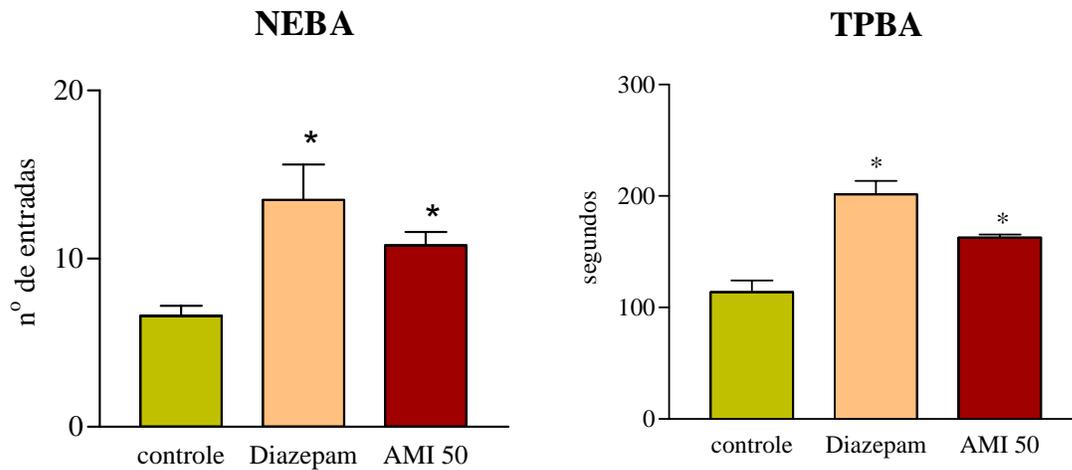


Figura 20 - Efeito da administração da AMI no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos. Nestes gráficos observa-se que os parâmetros avaliados NEBA (Número de Entradas nos Braços Abertos) e TPBA (Tempo de Permanência nos Braços Abertos) sofrem interferência após a administração da AMI, onde o efeito observado foi na dose 50 mg/Kg, i.p. Os valores acima foram retirados da Tabela 11. A concentração utilizada de Diazepam foi de 1 mg/Kg, i.p., como controle positivo. * $p < 0,05$ (ANOVA e Dunnet como *post hoc*).

5.5.2 Avaliação da coordenação motora

- Teste do Rota rod em camundongos

A avaliação da influência sobre a coordenação motora dos camundongos pela AMI foi testada, seguindo o procedimento descrito em 4.8.2. Os animais divididos em número de 8 por grupo foram tratados com AMI, controle (Tween 80 a 0,5 %) e diazepam (controle positivo) quando foram analisados os seguintes parâmetros: TP (Tempo de Permanência na barra giratória) e NQ (número de queda na barra giratória).

Em todos os parâmetros analisados a AMI, em nenhuma das concentrações testadas, alterou significativamente o comportamento dos animais, quando comparado ao controle, conforme mostra a **Tabela 12**.

Tabela 12. Efeito da administração da AMI em camundongos no teste Rota Rod em camundongos.

Grupo	TP(s)	NQ
Controle, i.p. (8)	58,8±0,3	1,1±0,3
Diazepam 1 mg/Kg, i.p. (8)	52,8±5,3	2,1±0,4
AMI 10 mg/Kg, i.p. (8)	49,6±4,7	1,6±0,4
AMI 25 mg/Kg, i.p. (8)	53,4±3,9	1,4±0,4
AMI 50 mg/Kg, i.p. (8)	51,9±4,7	1,5±0,4

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Valores são a média \pm EPM do número de animais especificado em parêntese. ANOVA e Dunnet como teste *post hoc*. TP = Tempo de permanência. NQ = Número de quedas.

5.6 Determinação da atividade inibitória da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI) sobre a agregação plaquetária humana *in vitro*

5.6.1 Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP em PRP

A **Figura 21** mostra as curvas referentes a AMI nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , utilizando o ADP 3 μM como agonista.

A **Tabela 13** contém os valores em cm, das alturas das curvas de agregação na presença do ADP (controle) e na presença de AMI nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , medidas como especificado em métodos, para amostras de sangue que originaram de 6 a 10 curvas. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.9.4, demonstrou a ocorrência de diferença significativa nas concentrações de AMI 100, 150 e 200 μM , em relação ao controle ($p < 0,05$ – ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey – Kramer).

Os dados da **Tabela 13** foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 22**). Os valores médios de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 10, 40, 64 (efeito máximo) e 60 % para AMI nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , respectivamente.

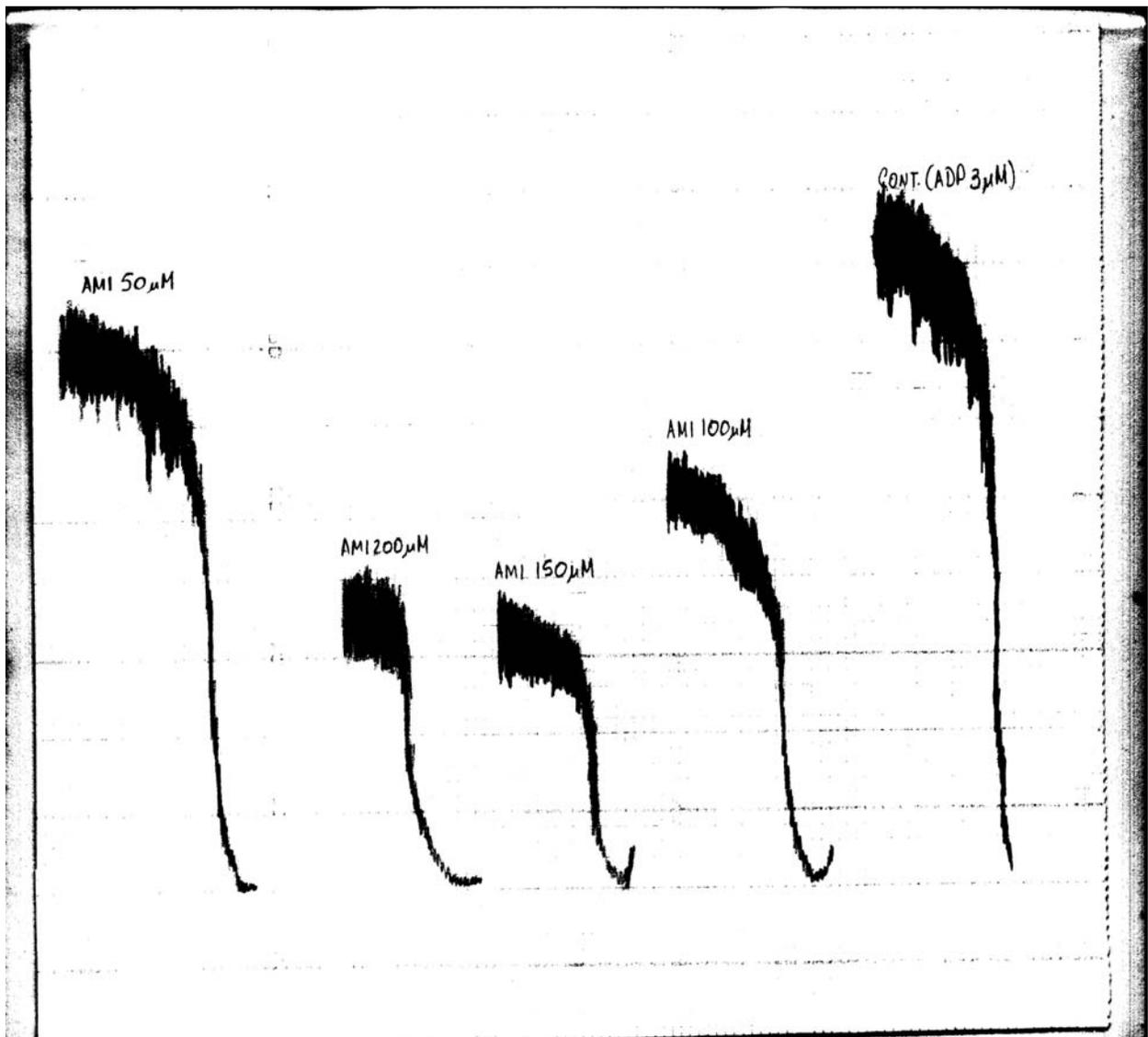


Figura 21 –Gráfico representativo das curvas de agregação obtidas com AMI na presença de ADP.

Inibição da agregação de plaquetas induzidas por ADP em Plasma Rico em Plaquetas (PRP), por diferentes concentrações de AMI. Obtido através do registro em papel impresso acoplado ao agregômetro, 10 min após a incubação do PRP com AMI e imediatamente após a adição do agonista (ADP).

Tabela 13. Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas humana induzida por ADP (3 μ M).

Grupo	Agregação plaquetária (altura da curva em cm)	Inibição (%)
Controle	8,85 \pm 0,21 (10)	
AMI(μ M)		
50	7,98 \pm 0,35 (07)	10
100	5,28 \pm 0,49 (06)*	40
150	3,15 \pm 0,48 (06)*	64
200	3,56 \pm 0,24 (08)*	60

Experimento realizado como descrito em materiais e métodos. Os valores são a Média \pm E.P.M. do número de experimentos em parêntesEs. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

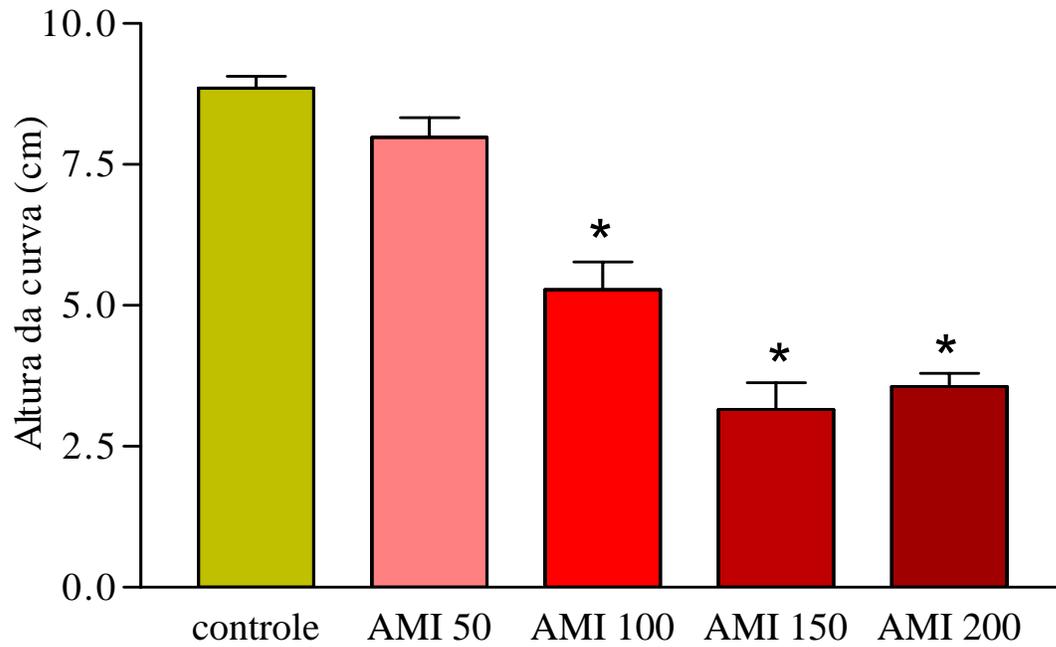


Figura 22 - Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas induzidas por ADP 3 μ M. Neste gráfico é demonstrada a atividade antiagregante plaquetária da AMI (μ M) em várias concentrações frente ao agonista ADP onde se vê inibição máxima com AMI 150 μ M. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle (Anova e Tukey como teste *post hoc*).

5.6.2 Inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno em PRP

A **Tabela 14** contém os valores da altura das curvas de agregação na presença do colágeno (controle) e na presença de AMI nas concentrações de 25, 50, 100, e 150 μM , medidas como especificado em métodos, para amostras de sangue que originaram de 40 a 10 curvas. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.9.4, demonstrou a ocorrência de diferença significativa nas concentrações de AMI 50, 100 e 150 μM , em relação ao controle ($p < 0,05$ – ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey – Kramer).

Os dados da **Tabela 14** foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 23**). Os valores médios de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 15, 26, 53 (efeito máximo) e 41 % para AMI nas concentrações de 25, 50, 100 e 150 μM , respectivamente.

Tabela 14. Efeito inibitório da AMI na agregação plaquetária humana induzida por colágeno (10 μ M).

Grupo	Agregação plaquetária (Altura da curva em cm)	Inibição (%)
Controle	8,89 \pm 0,19 (10)	
AMI(μ M)		
25	7,57 \pm 0,33 (04)	15
50	6,58 \pm 0,20 (06)*	26
100	4,15 \pm 0,29 (07)*	53
150	5,26 \pm 0,69 (05)*	41

Experimento realizado como descrito em materiais e métodos. Os valores são a Média \pm E.P.M. do número de experimentos em parênteses. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

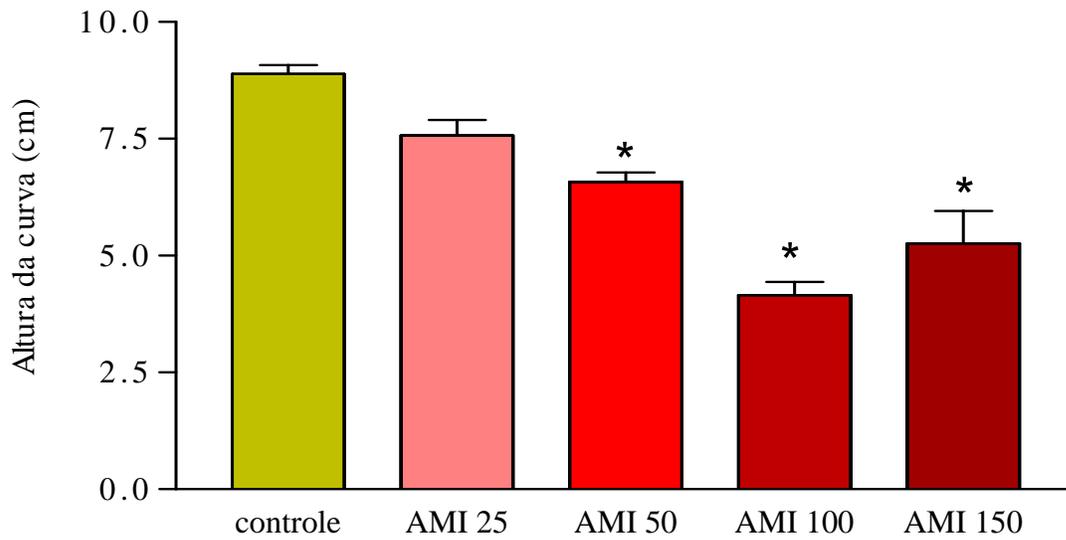


Figura 23 - Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas induzida por colágeno 10μM. Neste gráfico é demonstrada a atividade antiagregante plaquetária da AMI (μM) em várias concentrações frente ao agonista colágeno onde se vê inibição máxima com AMI 100 μM. (*) p<0,05 comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

5.6.3 Inibição da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico em PRP

A **Tabela 15** contém os valores da altura das curvas de agregação na presença do ácido araquidônico (controle) e na presença de AMI nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 μM , medidas como especificado em métodos, para amostras de sangue que originaram de 5 a 22 curvas. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.9.4, demonstrou a ocorrência de diferença significativa nas concentrações de AMI 25, 50, 100, 150 e 200 μM , em relação ao controle ($p < 0,05$ – ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey – Kramer).

Os dados da **Tabela 15** foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 24**). Os valores médios de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 15, 20, 21, 25 e 27 % para AMI nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 μM , respectivamente.

Tabela 15. Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas humana induzida por ácido araquidônico (150 µg/mL).

Grupo	Agregação plaquetária (altura da curva em cm)	Inibição (%)
Controle	8,91 ± 0,14 (22)	
AMI(µM)		
25	7,58 ± 0,39 (06)*	15
50	7,12 ± 0,26 (12)*	20
100	7,04 ± 0,37 (10)*	21
150	6,66 ± 0,22 (05)*	25
200	6,51 ± 0,13 (06)*	27

Experimento realizado como descrito em materiais e métodos. Os valores são a Média ± E.P.M. do número de experimentos em parênteses. (*) p<0,05 comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

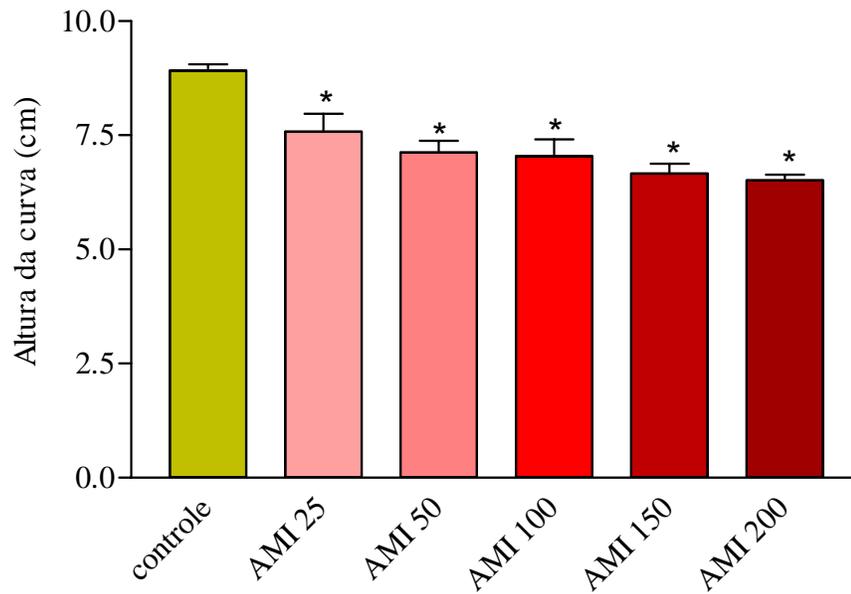


Figura 24 - Efeito inibitório da AMI na agregação de plaquetas induzida por ácido araquidônico 150 µM. Neste gráfico é demonstrada a atividade antiagregante plaquetária da AMI (µM) em várias concentrações frente ao agonista ácido araquidônico onde a inibição é pequena e não sofre interferência com aumento da dose. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

5.6.4 Avaliação da influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela alfa e beta amirina (AMI)

A influência do tempo de incubação do PRP com AMI, sobre a inibição da agregação plaquetária, foi avaliada segundo o procedimento descrito em 4.9.5.

Na mistura reagente de PRP somente com o agonista na qual foi utilizado como controle, foi obtido uma altura da curva registrada em cm de 8,85. Quando incubada por 10 min com AMI a altura foi de 5,2 cm, com 15, 20 e 30 minutos a altura foi de 5,3 ; 4,8 e 5,8, respectivamente.

Os resultados obtidos mostraram que o aumento do tempo de incubação não causou interferência sobre a inibição da agregação de plaquetas humanas frente ao agonista ADP, conforme a **Figura 25**.

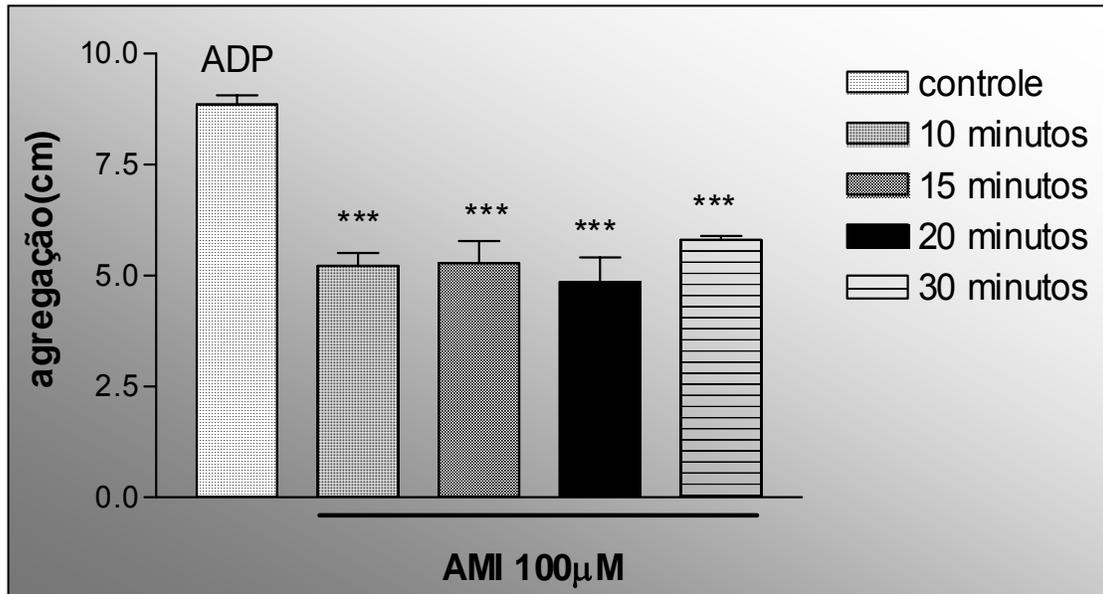


Figura 25 - Influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela AMI. Este gráfico mostra o efeito da AMI em função do tempo, onde se vê que não há nenhuma diferença nos níveis de inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP ($3\mu\text{M}$) quando foi aumentado o tempo de incubação da AMI no PRP. *** $p < 0,0001$ comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

5.6.5 Determinação da potencialização pela alfa e beta amirina (AMI) da ação inibitória da aspirina sobre a agregação plaquetária

A potencialização pela AMI da ação inibitória do ácido acetilsalicílico (AAS) sobre a agregação de plaquetas humanas induzidas pelos agonistas ADP, colágeno e ácido araquidônico (AA) em PRP, foi determinada segundo procedimento descrito em 4.9.6.

A **Tabela 16** mostra os valores da altura das curvas de agregação do agonista (controle), AAS, AMI e AMI na presença de AAS, medidas como especificado em 4.9.6, para amostras de sangue que originaram de 6 a 12 curvas. A análise estatística dos dados, realizada como descrito em 4.9.6, mostrou que houve diferença significativa para o grupo AMI + AAS, em relação ao grupo AAS ou AMI sozinhas com inibição de 40, 19 e 20 % para os agonistas ADP, colágeno e AA, respectivamente ($p < 0,05$ – ANOVA e teste de Tukey – Kramer) quando comparadas ao controle.

Dados da **Tabela 16** foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 26**).

Tabela 16. Potencialização pela AMI na inibição dos efeitos do AAS na agregação de plaquetas humana induzidas por ADP, colágeno e ácido araquidônico .

Grupo	ADP(3 μ M)	Agonistas Colágeno(10 μ M)	AA(150 μ g/mL)
Controle	8,85 \pm 0,21(10)	8,89 \pm 0,19(10)	8,91 \pm 0,14(22)
AMI 50 μ M	7,98 \pm 0,35(07)	6,58 \pm 0,20(06)	7,12 \pm 0,26(12)
AAS 25 μ M	7,90 \pm 0,33(06)	7,47 \pm 0,21(04)	7,96 \pm 0,23(06)
AAS25+AMI50	5,30 \pm 0,31(06)* (40%)	7,20 \pm 0,31(04)* (19%)	7,11 \pm 0,30(06)* (20%)

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Solução de Tween 80 a 0,5 % utilizada como veículo foi usada como controle. Acima estão descritos a Média \pm EPM e em parêntese o número de curvas feitas para cada concentração testada. Abaixo da média está assinalado percentual de inibição. *p<0,05 quando comparado ao controle (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

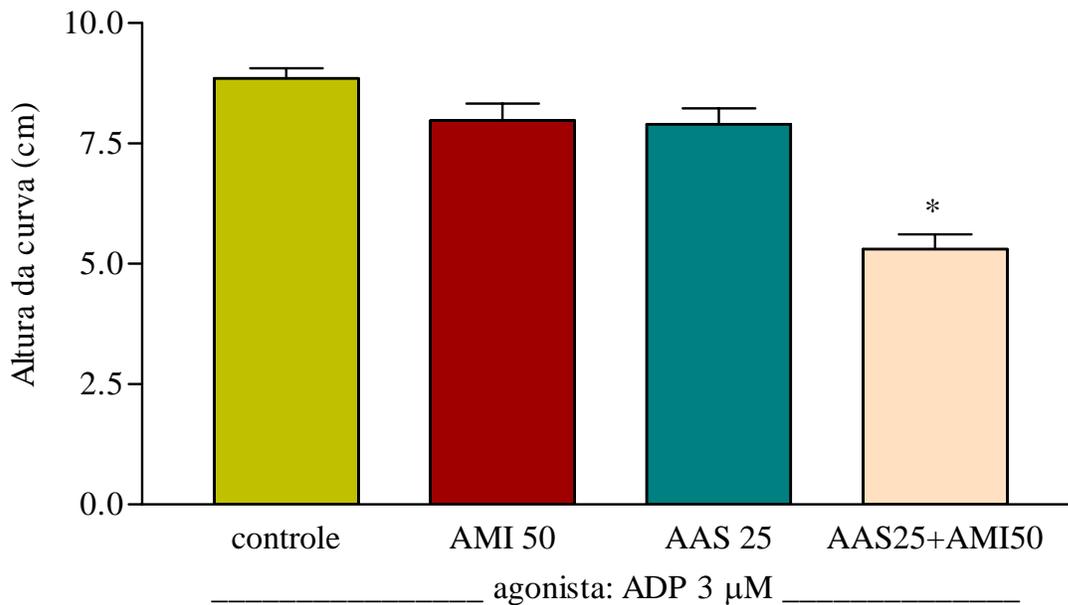


Figura 26 - Interferência da AMI na inibição da agregação plaquetária induzida pelo AAS. O gráfico acima mostra o efeito da AMI (μ M) associada ao AAS (μ M), onde as drogas usadas isoladamente não inibem significativamente a agregação plaquetária, entretanto, quando associadas, a inibição foi significativa, na ordem de 40 %, frente ao agonista ADP. Os dados deste gráfico foram extraídos da Tabela 16. * $p < 0,05$ (ANOVA e Tukey como teste *post hoc*).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Estudar os isômeros alfa e beta amirina isoladamente seria o ideal, mas a separação destas duas substâncias não foi possível no Laboratório de Química Orgânica da UFC, que nos enviou o material, já que a ocorrência na natureza desta mistura isomérica é muito comum, mas também muito difícil à purificação. Desta forma foi utilizada no presente trabalho, a mistura isomérica dos dois triterpenos, alfa e beta amirina, com o objetivo de estudar algumas de suas atividades farmacológicas enfatizando aquelas relacionadas a inflamação, nocicepção, SNC e agregação plaquetária.

A mistura isomérica de amirina (AMI) não apresenta em sua estrutura química, grupamentos que possam conferir hidrossolubilidade, assim a molécula triterpênica de amirina apresenta como característica físico-química a lipossolubilidade, sendo imiscível em veículos aquosos, o que nos levou a adicionar Tween 80 a 0,5% em todas as soluções preparadas para realização dos experimentos. As soluções para serem utilizadas como controle, também tiveram este percentual do agente emulsionante, em todos os experimentos, com a finalidade de excluir a possibilidade de interferência do Tween 80.

Considerando que as vias de administração em todos os testes utilizando camundongos foram intraperitoneal e oral, e que, em todos os experimentos realizados o efeito foi maior quando a AMI foi utilizada por via intraperitoneal, esses resultados indicaram que a AMI oferece dificuldades para chegar a corrente circulatória pela via oral, o que conseqüentemente torna o efeito farmacológico menor, nesta condição.

Amirina e o processo inflamatório

Os triterpenóides alfa-amirina e beta-amirina, assim como seus ésteres, foram descritos em várias referências como possuidores de atividade antiinflamatória. Acetato de alfa-amirina e beta-amirina reduzem a sínteses de 5-HETE sem interferir na síntese de LTB₄. (Kweifio-okai e Macrides, 1992). A alfa-amirina é um potente inibidor da subunidade catalítica de proteína quinase dependente de AMP-c (Hasmeda e cols., 1999).

A atividade antiartrítica da amirina, provavelmente foi uma das mais estudadas e ocorre por uma redução da infiltração de leucócito no processo inflamatório (Kweifio-okai e cols. 1994).

A inflamação é a reação do organismo à invasão por um agente infeccioso ou apenas reação à uma lesão física. Esta reação atrai leucócitos e moléculas plasmáticas para o local da infecção ou do dano tecidual (Cheng e cols., 2003).

O processo inflamatório é invariavelmente caracterizado por uma produção de histamina, bradicinina, fator de agregação plaquetária (PAF) e interleucina-1 (IL-1) e por uma liberação de substâncias químicas dos tecidos tais como as citocinas e migração de células. Citocinas pró-inflamatórias como $TNF\alpha$, Interleucina -1 (IL-1) e Interleucina-6 (IL-6) contribuem para um aumento do processo inflamatório (Mitchell e cols., 1995).

O ácido araquidônico é o mais abundante ácido graxo poliinsaturado encontrado nos fosfolipídios da membrana celular. A ativação da fosfolipase A_2 (PLA_2), em resposta a vários estímulos libera o ácido araquidônico, este é então metabolizado por dois caminhos enzimáticos principais: ciclooxigenase e 5-LOX, conduzindo aos mediadores pró-inflamatórios, prostanóides e leucotrienos (LTs), respectivamente (Charlier e Michaux, 2003).

Os prostanóides são mediadores locais da inflamação e moduladores das funções fisiológicas, incluindo a manutenção da integridade da mucosa gástrica, a regulação da hemodinâmica microvascular renal, liberação de renina e eletrólitos tubulares e reabsorção de água. Os prostanóides são sintetizados a partir do ácido araquidônico pelas ciclooxigenases (Cheng e cols., 2003). Existem duas isoformas de ciclooxigenase, que são COX-1 e COX-2. Há evidências significativas que a inflamação está associada a um aumento nos metabólitos do ácido araquidônico no sangue e nos tecidos. (Feuerstein e Hallenbeck, 1987). Por sua vez, este aumento está associado com a síntese da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), a qual é codificada por um gene diferente (localizado no cromossomo 1) do gene que codifica a enzima constitutiva COX-1, localizado no cromossomo 9 (Yokoyama e Tanabe, 1989). A expressão da enzima COX-2 desenvolvida em processo inflamatório em muitos diferentes tipos de células é secundária

a ativação da proteína tirosina quinase (Akarasereenont e cols., 1995) e da transcrição do Fator Nuclear κ B (NF- κ B) que é um fator de transcrição gênica (Xie e cols., 1992; Mitchell e cols., 1995), sendo esta ativação enzimática definida como citocina-induzida e glicocorticóide-inibida (Cheng e cols., 2003).

A enzima Prostaglandina endoperóxido H sintase, mais conhecida como ciclooxigenase ou COX desempenha duas atividades catalíticas distintas, primeiro a ciclooxigenase oxida AA a hidroperoxi-endoperóxido (PGG₂) que é instável e imediatamente pela mesma enzima ocorre uma reação de peroxidação que reduz PGG₂ a hidroxí-endoperóxido ou PGH₂ (Sautebin e cols., 1995). Depois, a também instável PGH₂ é transformada por diversas sintases e isomerases tecido-específica em prostanóides. Este termo inclui as prostaglandinas (PGD₂, PGE₂ e PGF_{2 α}), prostaciclina (PGI₂) e tromboxano A₂ (TXA₂), como mostra a **Figura 27** (Ristimki e cols., 1994).

Como estes prostanóides exercem funções tanto autócrinas quanto parácrinas estes lipídios bioativos podem ser conceituados como hormônios locais. Na verdade, uma vez que o prostanóide é formado ele sai da célula e então interage com a proteína G acoplada a receptor na célula origem ou em células vizinhas para modular os níveis de segundos mensageiros (Tedgui e Mallat, 2001).

Através deles a distribuição tissular depende do material enzimático celular, prostanóides estão envolvidos numa variedade de respostas fisiológicas e patofisiológicas (Tedgui e Mallat, 2001). No Sistema cardiovascular, PGD₂ e PGE₂ assim como PGI₂ são potentes vasodilatadores considerando que TXA₂ exibe propriedades vasoconstritoras. TXA₂ também exerce um papel fundamental na indução da agregação plaquetária, enquanto a PGI₂ apresenta propriedades anticoagulantes (Charlier e Michaux, 2003).

Os prostanóides são mediadores das respostas do organismo na injúria tissular ou inflamação. PGE₂ e PGI₂ são potentes vasodilatadores agindo em sinergismo com outros autacóides como a histamina ou bradicinina. A ação combinada destes dois compostos nos capilares contribui para um aumento no fluxo de sangue local na inflamação aguda. Estes compostos aumentam a permeabilidade vascular que conduz ao edema tecidual do processo inflamatório e também produzem hiperalgesia por uma ação

sensitiva nos terminais periféricos de fibras sensoriais. Além disso, PGE_2 age nos neurônios e contribui para uma resposta sistêmica da inflamação como febre, fadiga e hipersensibilidade a dor (Charlier e Michaux, 2003).

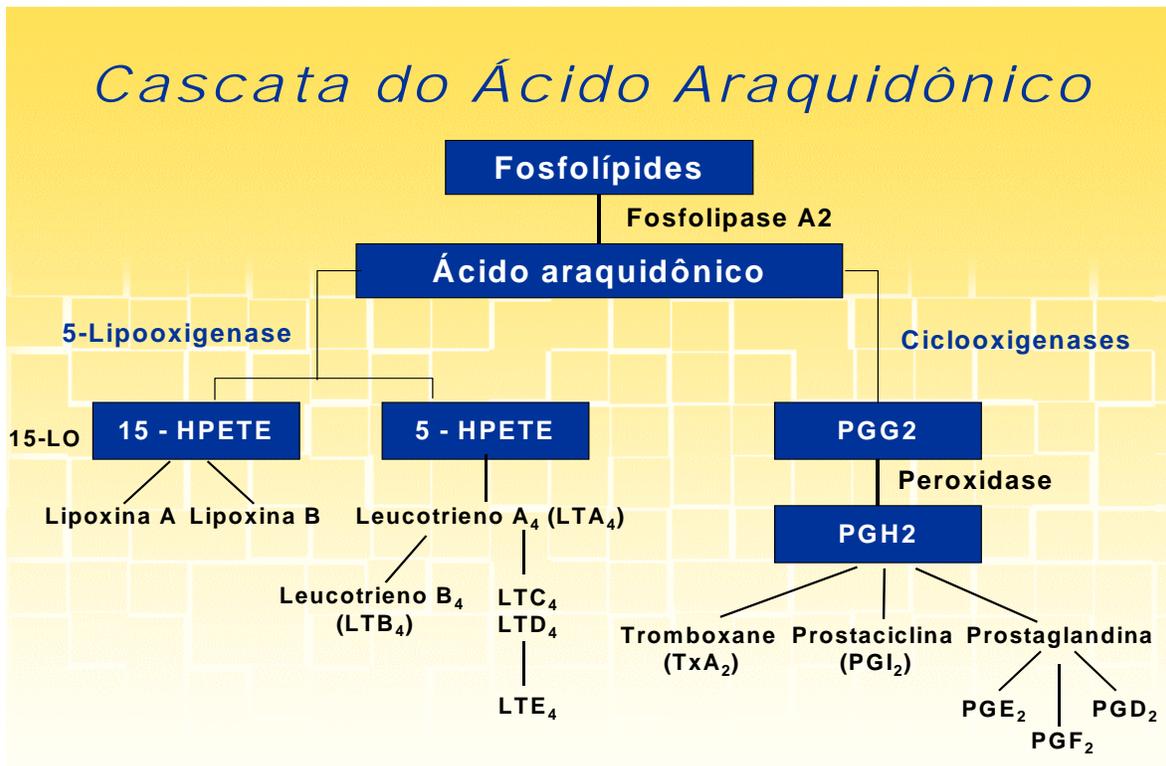


Figura 27 – Biossíntese de prostanóides a partir do ácido araquidônico.

Metabolização do ácido araquidônico pela 5-lipoxigenase e por ciclooxygenase originando prostanóides bioativos.

Fonte: <http://home.furb.br/jemoura/william%20Chahade.Comandatuba.ppt>.

A atividade antiinflamatória da AMI foi investigada utilizando os modelos de inflamação aguda, edemas induzidos por injeção de carragenina ou dextrano na pata de camundongos de forma profilática e terapêutica e edema de pata induzido em carragenina em ratos.

A carragenina (polissacarídeo sulfatado) é o agente flogístico de escolha para investigação da atividade antiinflamatória de compostos químicos por depender inteiramente de um estímulo local, não apresentar potencial antigênico, não produzir efeitos sistêmicos, manifestar um elevado grau de reprodutibilidade e sua ação poder ser inibida por antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais (Winter e cols., 1962).

A injeção subplantar ou intratorácica de carragenina induz o aparecimento de edema bifásico em camundongos. Durante a primeira fase (0 - 24 horas), o edema é de baixa intensidade não apresentando relação dose-resposta. Após 24 h a reação é mais intensa, atingindo o máximo entre 48-72 h. A análise diferencial dos leucócitos mostrou que 4 h após a injeção de carragenina ocorre predomínio de neutrófilos no sítio da inflamação que é seguido por imenso acúmulo de células mononucleares na 2ª fase de reação. A análise farmacológica mostrou que o edema agudo (4 horas) foi mediado por histamina, bradicinina e prostaglandinas. Por sua vez, o edema tardio (48 h) foi mediado por PAF e LTD₄ (Henriques, 1993).

Vários mediadores químicos estão envolvidos na primeira fase da inflamação. Prostaglandinas, cininas, 5-hidrotriptamina (5-HT) e histamina são apontadas como mediadores envolvidos no edema causado por carragenina (Willis, 1969). A atuação do sistema complemento e o papel desses mediadores no edema induzido por carragenina na pata de rato foram investigados por Di Rosa e cols., (1971). Os resultados obtidos demonstraram a participação do sistema complemento, do início ao fim, na reação inflamatória. Quanto aos mediadores envolvidos, três etapas foram distinguidas: a inicial (correspondendo aos primeiros noventa minutos), com liberação concomitante de histamina e 5-HT, a segunda (de noventa a cento e cinquenta minutos), mediada por cininas e finalmente a terceira (a partir de cento e cinquenta minutos), com atuação de prostaglandinas. Todos esses mediadores mostraram ser dependentes do sistema

complemento para o exercício de sua atividade. Evidências indicaram a histamina e 5-HT como responsáveis pela ocorrência de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular na etapa inicial do processo inflamatório (Di Rosa e cols., 1971).

O envolvimento de bradicinina nas reações inflamatórias agudas e sua capacidade de induzir o aumento da permeabilidade de vasos sanguíneos foi relacionado com o edema induzido por carragenina em pata de rato (Ronald e Christopher, 1990). A infiltração maciça de leucócitos polimorfonucleares é observada na terceira etapa do edema induzido por carragenina na pata de rato (Di Rosa e Willoughby, 1971).

No presente trabalho, a mistura isomérica de alfa e beta-amirina (AMI) produziu efeito no edema induzido por injeção de carragenina na pata de camundongos. AMI demonstrou uma intensa atividade antiinflamatória inibindo o efeito edematogênico da carragenina na primeira hora, a qual é representada pelo aumento de transudação e um incremento na permeabilidade vascular (Kwefio-Okai e cols, 1994). A AMI inibiu o edema quando administrada, tanto por via intraperitoneal como por via oral, guardando uma relação de dose-resposta. O efeito significativo foi maior na terceira hora, em todas as doses testadas, após a administração do agente flogístico, onde acontece a liberação de bradicinina, acúmulo de prostaglandinas e infiltração de leucócitos polimorfonucleares. Considerando as vias de administração testadas (intraperitoneal e oral) as doses eficazes por via intraperitoneal foram menores, indicando que a absorção oral de AMI a torna menos eficiente.

A AMI quando associada a indometacina não produziu um grande aumento nos percentuais de inibição máxima nas patas dos camundongos, não sendo muito superior as inibições provocadas pelas substâncias administradas isoladamente, concluindo que esta potencialização não foi tão intensa o que pode indicar que o mecanismo de ação da AMI não envolve inibição de cicloxigenase.

Quando a AMI foi administrada depois da formação do edema, isto é, quando utilizada para o tratamento do edema induzido por carragenina, simulando assim um efeito terapêutico (curativo), observamos que este efeito terapêutico da AMI foi significativo entre a 4^a e 6^a horas após a injeção da carragenina onde há um predomínio de

neutrófilos e células mononucleares e de mediadores tais como, histamina, bradicinina e prostaglandinas.

Trabalhos recentes demonstraram que a alfa-amirina possui uma potente atividade como inibidor competitivo de algumas proteínas quinases como: Quinase AMPc- dependente e PKC (Hasmeda e cols, 1999). Também foi demonstrado que a alfa e beta-amirina apresentam atividade antiinflamatória contra inflamação induzida por éster de formol (Akihisa e cols., 1996). Outros trabalhos demonstraram que alfa-amirina é um potente inibidor não competitivo da tripsina e quimiotripsina. Estes triterpenóides hidrofóbicos representam exemplo de antiinflamatório inibidor seletivo de proteases.

Após administração intraperitoneal, a AMI também inibiu de modo dose-dependente o edema induzido por injeção de dextrano na pata de rato. As inibições máximas aconteceram também na terceira hora após a injeção de dextrano com as doses testadas. Quando administrada por via oral as inibições foram menores que as observadas por via intraperitoneal, comprovando que sua absorção irregular no trato gastrointestinal, compromete sua eficácia.

O edema da pata de rato induzido por dextrano (polissacarídeo sulfatado) envolve a degranulação de mastócitos e, portanto resulta principalmente da liberação de histamina e 5 – HT. A reação inflamatória causada por dextrano difere daquela provocada por carragenina, visto que é caracterizada pela presença de um número pequeno de leucócitos no exsudado (Di Rosa e Willoughby, 1971; Ialenti e cols, 1992 e Masso e cols, 1993).

Quando o modelo de verificação da eficácia terapêutica da AMI foi testado, induzindo um edema com dextrano para em seguida à formação do edema ser efetuado o tratamento, observamos que, também, o efeito máximo foi obtido por volta da 3ª hora, sendo que nos dois experimentos utilizando o dextrano como agente edematogênico, notamos que a AMI foi mais eficaz que no modelo utilizando a carragenina, sugerindo que o mecanismo de ação da AMI envolve a inibição de agentes que estejam envolvidos na gênese do processo inflamatório promovido pelo dextrano.

O Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- α) é uma potente citocina pró-inflamatória e é produzida por uma grande variedade de células onde tem sido implicado em diversas condições patológicas como as doenças auto-imunes (tais como, artrite reumatóide, diabetes melitus insulino-dependente), asma, choque séptico, rejeição de órgãos e infecção por HIV (Junger e Sorkin, 2000). O mecanismo de ação envolve a ativação de fatores de transcrição gênica, sendo os mais importantes o Fator Nuclear Kappa B (NF κ B) e a Proteína Ativadora 1 (AP1). O NF κ B é um heterodímero composto por duas subunidades protéicas a P65 ou Rel A e a p50, esses números correspondem ao seu peso em Kda. e esta proteína está presente no citossol da célula complexado com a molécula de I κ B, a qual inibe a sua ação (Eder, 1997).

A ativação dos fatores de transcrição gênica pelo TNF- α depende da ligação deste ao seu receptor celular e, por conseguinte ativação de suas funções intracelulares, o que tem como consequência a fosforilação da molécula I κ B por uma proteína quinase, onde ocorre uma conjugação do I κ B pela ubiquitina (ubiquitinização) e subsequentemente uma degradação do I κ B por proteossomas com consequente liberação do fator NF κ B que se translocará para o núcleo da célula e ativará a expressão gênica, como mostrado na **Figura 28** (Eder, 1997).

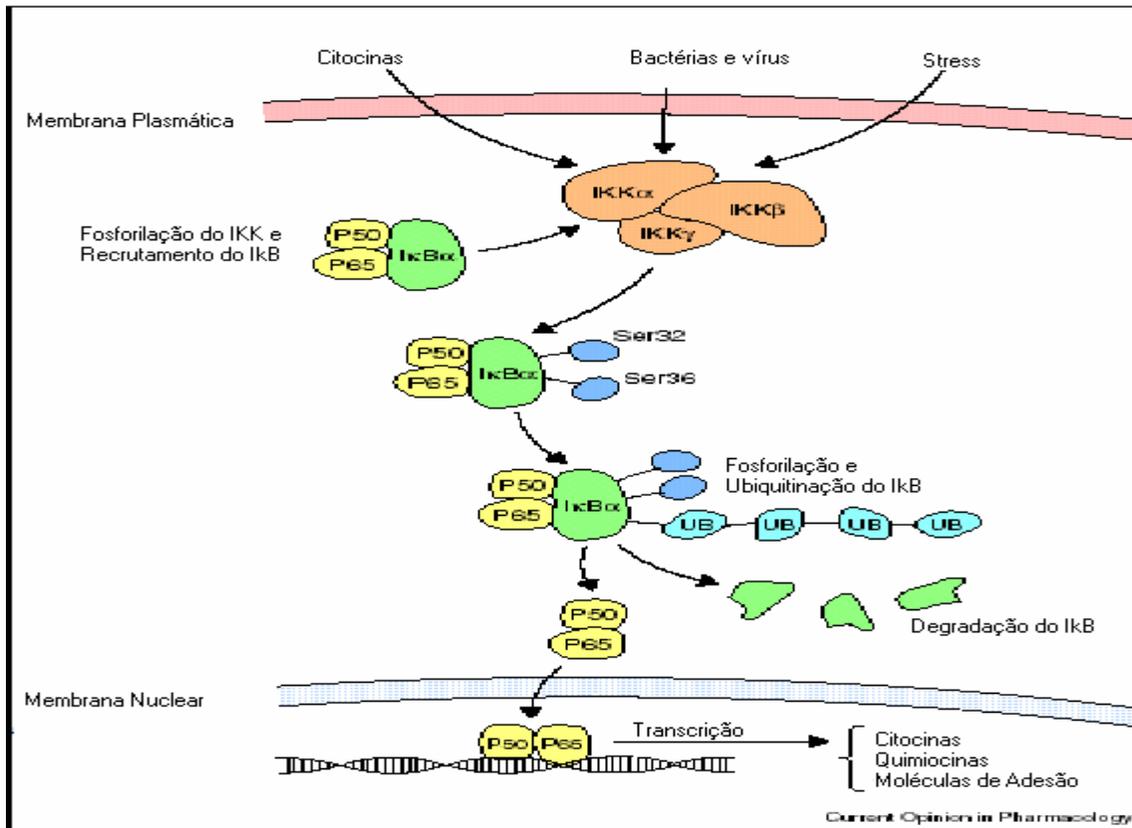


Figura 28- Ativação, fosforilação e degradação do IκB com conseqüente liberação do NFκB(P50/P65).

Fonte: Roshak, A. K. e cols, 2002.

O TNF- α é estimulado por fatores tais como irradiação UV, estresse oxidativo e lipopolissacarídeo (LPS) induzindo a ativação simultânea das Cascatas de Quinase e NF κ B. Evidências mostraram que existem conexões entre estes dois caminhos, as quais foram estabelecidas a nível molecular (Eder, 1997).

Uma nova família de proteínas, TRAFs (fatores associados ao receptor de TNF), que consiste em seis membros TRAF 1 – 6, constitui a principal mediadora para a ativação celular, sobrevivência celular e função antiapoptose da superfamília de receptores de TNF. O TNF- α pode ligar-se a dois tipos de receptores o TNF-R1 e o TNF-R2 que quando ativados recrutam a TRAF-2 (fator 2 associado ao receptor de TNF), esta proteína (TRAF-2) está envolvida com os dois receptores de TNF- α . No caso do receptor tipo-1 a TRAF-2 interage via TRADD que é um domínio morto associado ao receptor do TNF- α . No caso do receptor tipo-2 do TNF- α , a TRAF-2 age diretamente no domínio intracelular do receptor que por sua vez ativa uma quinase indutora de NF κ B (NIK) esta então ativa o IKK (Quinase do Inibidor K) que fosforila o I κ B-NF κ B onde libera o NF κ B para o núcleo celular, como mostra a **Figura 29**, outra via de liberação de NF κ B através da fosforilação da TRAF-6 é ilustrada na **Figura 30** (Eder, 1997).

O entendimento do mecanismo de ação do TNF- α e de algumas doenças de origem inflamatória levou nos últimos anos a um extensivo trabalho de pesquisas de inibidores de TNF- α para tratar doenças até o momento de difícil tratamento. A espondiloartrite pode levar a uma destruição da articulação, com uma diminuição da qualidade de vida e um incremento da morbi e mortalidade, onde em muitos casos uma simples terapêutica com analgésicos não é suficiente (Feldmann e Maini, 2002)

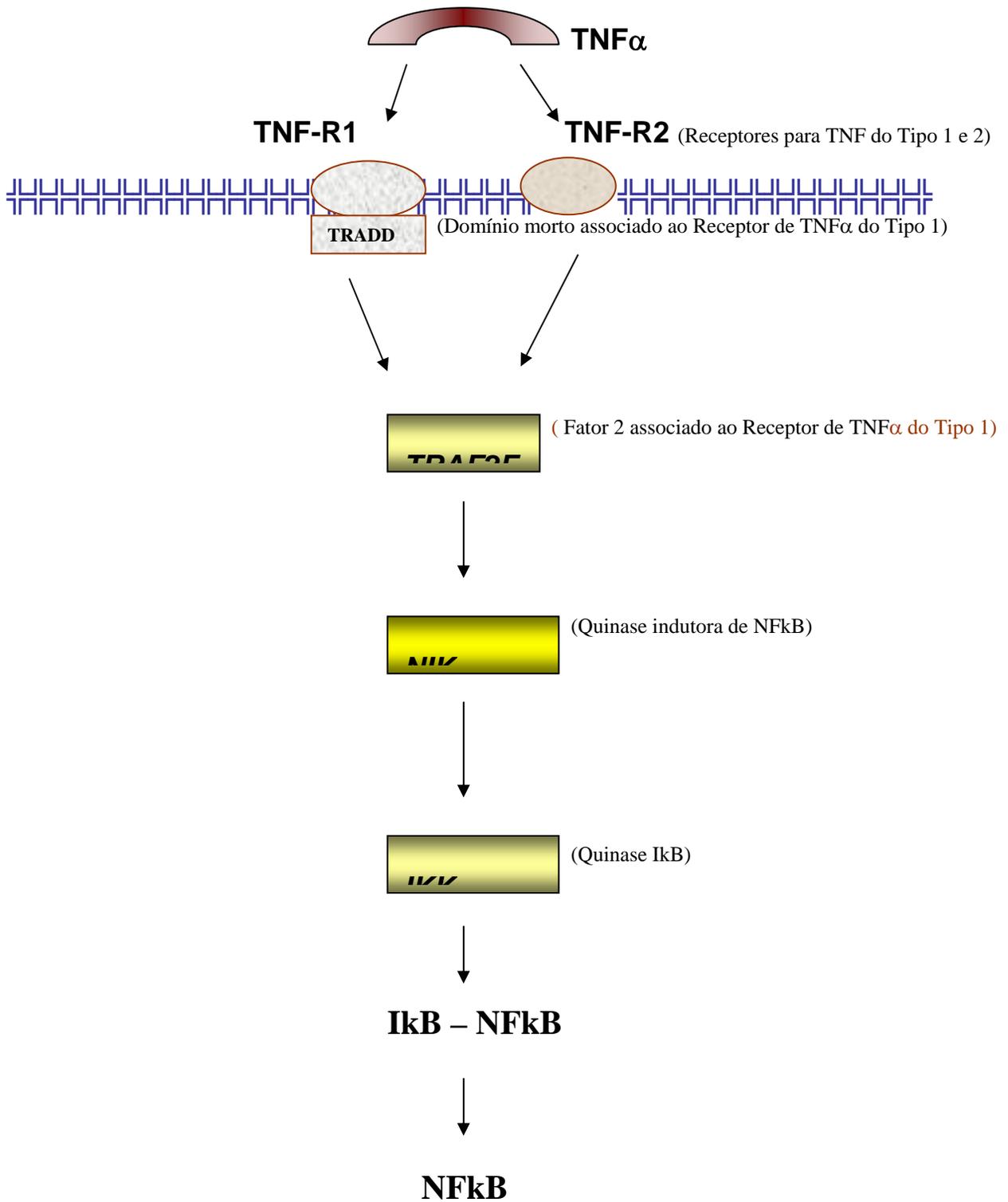


Figura 29 - Ativação do NF κ B através da estimulação de receptores para TNF α , via TRAF2.

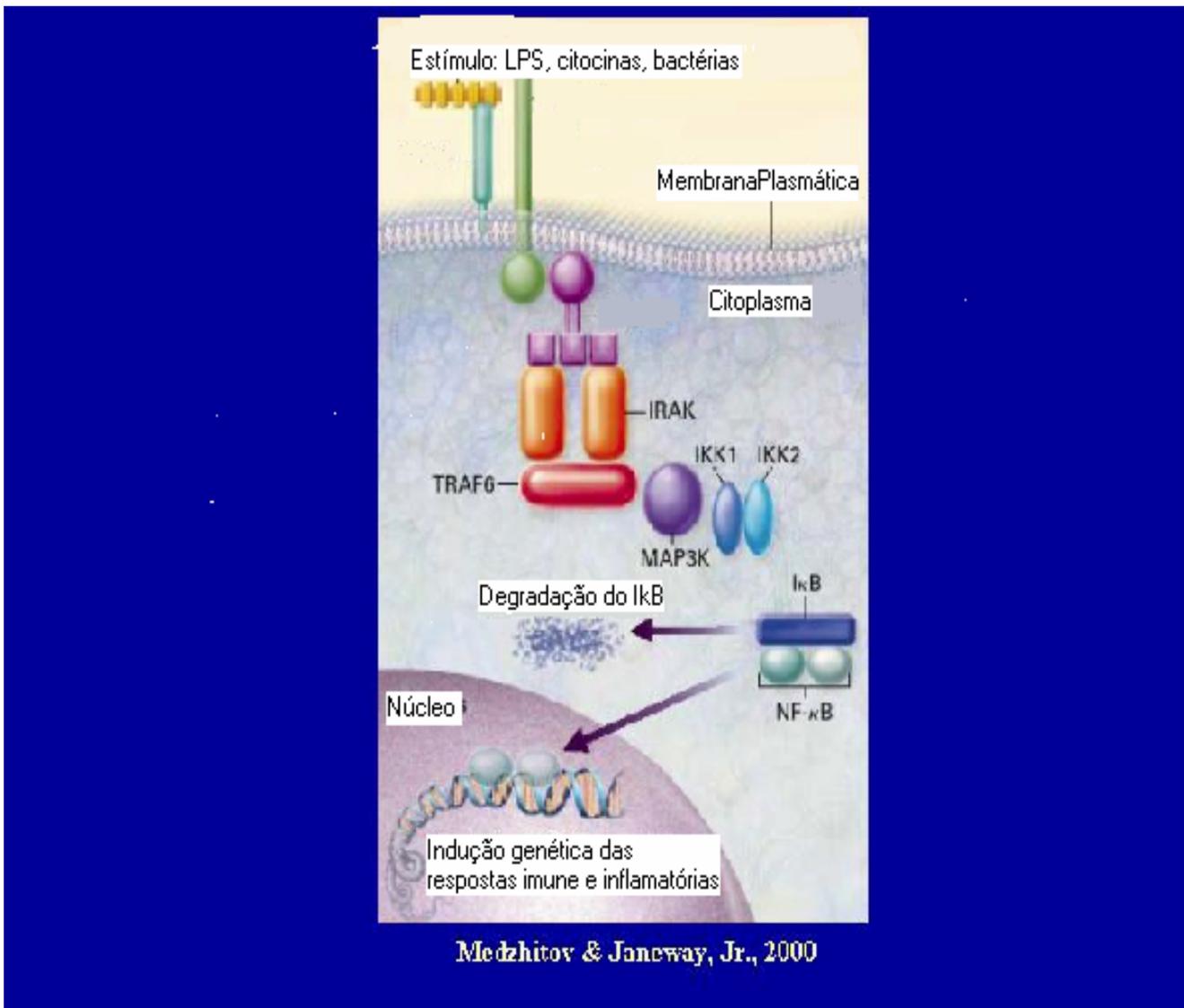


Figura 30 - Esquema da indução gênica das respostas imune e inflamatórias através da ativação da enzima TRAF-6 e conseqüente liberação de NFκB para o núcleo celular. IRAK = Quinase associada ao receptor de IL-1; TRAF-6 = Fator 6 associado ao receptor de TNFα; IKK = Quinase IκB.

Fonte: Medzhitov e Janeway, 2000.

O TNF- α é encontrado em altas concentrações no sangue e fluidos sinoviais de pacientes com artrite reumatóide, estudos básicos da patogênese da artrite reumatóide identificam o TNF- α como o mediador central da inflamação crônica que resulta na inflamação da articulação e degradação e diminuição da função destas articulações. Desenvolvimentos paralelos de Anticorpos Monoclonais e tecnologia de anticorpos de DNA recombinante tem originado vários potentes agentes biológicos que bloqueiam especificamente os efeitos deletérios do TNF- α . Dois anticorpos monoclonais, infliximab e adalimumab, assim como uma proteína de fusão de receptor (etanercept), agentes inibidores do TNF- α demonstraram resultados encorajadores para tratar este tipo de artrite. Estes agentes tem demonstrado alta eficiência para tratar artrite reumatóide e diminuem a progressão de danos aos ossos e articulações por imunomodulação (Fleischmann e Shealy, 2003).

Para melhor investigação do mecanismo de ação da AMI foi utilizada Talidomida para confirmar uma hipótese de envolvimento de TNF- α nos efeitos da AMI. A Talidomida que foi desenvolvida como um agente sedativo não barbitúrico foi retirada do mercado na década de 60 após serem confirmados vários casos de teratogenicidade. Gradualmente a talidomida foi reintroduzida para o tratamento de algumas doenças de pele que incluem o eritema nodosum da hanseníase, úlceras de mucosa severa (por exemplo, associado com infecção de HIV), infiltrações linfocíticas e lupus cutâneo eritematoso. Recentes trabalhos e pesquisas farmacológicas apontam para uma modulação de produção de citocinas, principalmente reduzindo os níveis de TNF- α e inibição de angiogênese levantou a idéia de que a talidomida pode ser útil para algumas doenças inflamatórias e condições neoplásicas (Rowland e cols., 2000).

Uma das principais propriedades da talidomida é a diminuição da produção de TNF- α de monócitos humanos relacionados à degradação de um RNA mensageiro para TNF- α , sem inibição da síntese de proteínas. Estes efeitos foram

confirmados em estudos *in vivo* em pacientes com hanseníase (eritema nodosum), entretanto o mecanismo molecular exato é ainda desconhecido (Moreira e cols., 1993; Klausner e cols., 1996).

A inibição da produção de TNF- α foi confirmada também pela inibição da ativação do Fator Nuclear kappa B (NF κ B), o qual é um fator de transcrição para o TNF- α , e este mecanismo parece envolver a inibição da enzima NF κ B Quinase (Corral e Kaplan, 1999; Keiffer e cols., 2001). A talidomida pode também inibir a produção de interleucina 6 (IL-6), IL-1, alguma quimiocinas, e a IL-8. Finalmente a talidomida inibe a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em monócitos de pacientes infectados, aparentemente por inibição do TNF- α (Laffitte e Revuz, 2000; Randski e Levine, 2001).

Em nível celular a talidomida reduz a suscetibilidade de monócitos e células polimorfonucleares para fatores quimiotáticos, diminui a fagocitose e diminui a produção de superóxido e de outros radicais livres. A talidomida pode antagonizar prostaglandinas E₂ e F₂, histamina, serotonina e acetilcolina, e pode ter uma ação estabilizante da membrana lisossomal, efeito similar àquele apresentado por glicocorticóides (Randski e Levine, 2001).

A atividade articular do palmitato de alfa-amirina foi avaliada em modelo animal utilizando ratos, em análises histológicas de articulações interfalangeais proximal do pé ficou demonstrado uma redução na proliferação sinovial da articulação e redução de infiltração de leucócitos na medula do osso e tecido periarticular de ratos tratados, sugerindo que este éster da amirina tem eficácia em processos inflamatórios crônicos como a artrite (Kweifio-Okai e cols., 1995).

Como já descrito anteriormente, quando utilizamos uma associação de Indometacina e AMI no edema de pata induzido por carragenina em camundongos, verificamos que as reduções no edema não foram significativas se comparado como grupos tratados isoladamente com indometacina e AMI, o que vem levantar a hipótese de que a atividade inflamatória não envolve a inibição de enzimas que

fazem parte da cascata do ácido araquidônico. Kweifio-Okai e cols. (1994) demonstraram que alfa-amirina e seus ésteres (palmitato e linoleato) possuem uma baixa atividade anticiclooxygenase.

Para testar a atividade antiartrítica dos triterpenos alfa amirina e de seus ésteres, foram utilizados como modelos, dois processos cruciais na artrite destrutiva de proliferação sinovial de fibroblastos, quais sejam a cultura de osteosarcoma de ratos e a destruição de colagenase sinovial usando articulações artríticas. A indometacina e o metotrexato foram utilizados como controles positivos. Os resultados demonstraram que a alfa amirina e seus ésteres possuem efeitos maiores que a indometacina porém menores que metotrexato, que inicialmente era uma droga utilizada como anticâncer por inibição da síntese de DNA. Os resultados então indicaram que os efeitos antiproliferativo dos triterpenos podem ser cruciais para seus efeitos terapêuticos (Kweifio-Okai e cols, 1994)

Outros triterpenos do grupo da amirina foram demonstrados possuir efeito inibitório da serina protease e elastase de leucócitos humanos (Ying e cols., 1991). Triterpenos pentacíclicos do grupo da amirina possuem também efeitos antiproteolíticos gerais (Chaudhari e cols., 1974). Estes efeitos antiproteolíticos específicos incluem inibição da atividade da colagenase e antielastinolítico. Assim a inibição da proliferação de fibroblastos e efeitos antiproteolíticos de triterpenos da amirina podem explicar os efeitos artiartríticos da amirina em modelos animais com ratos (Kweifio-Okai e cols, 1994).

Assim, para uma melhor compreensão do mecanismo molecular de ação da amirina, uma vez que esta demonstrou em nossos experimentos uma atividade antiinflamatória, mas o mecanismo de ação não foi justificado pela inibição de ciclooxigenase, utilizamos um modelo de associação de amirina com talidomida. O objetivo era o possível envolvimento de TNF- α no mecanismo de ação da AMI e para isto foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. Constatamos que a talidomida administrada aos ratos sozinha exerce um bom efeito antiinflamatório, a AMI na dose de 10 mg/Kg exerce também um efeito

antiinflamatório, principalmente na 3ª e 4ª hora, a AMI na dose de 25 mg/Kg exerce um potente efeito antiinflamatório, efeito este duradouro abrangendo a 24ª hora. Quando foi administrado em ratos a Talidomida e em seguida a AMI foi observada uma resposta muito maior que a obtida quando os grupos receberam as mesmas drogas isoladamente, indicando uma potencialização de efeito destas drogas.

Recentes trabalhos demonstram que a α -amirina desempenha função de inibidor de proteína quinase sinalizadoras celulares de eucarióticos, onde demonstrou potente atividade inibitória específica sobre a unidade catalítica (cAK) de proteína quinase AMPc dependente (PKA), também efeitos inibitórios sobre a proteína quinase Ca^{2+} -dependente (CDPK) com IC50 de 52 μM e sobre a proteína quinase Ca^{2+} e fosfolípido dependente (PKC) e IC50 de 32 μM . Vários triterpenos anfifílicos, como ácido litocólico, ácido ursólico e ácido oleanólico, lupeol e inclusive a α -amirina são potentes e seletivos inibidores cAK. Os fatos comuns destes triterpenóides anfifílicos são os grupos 3-hidroxi (um grupamento polar distal) e um núcleo triterpenóide não polar e quase planar. Outros produtos naturais anfifílicos envolvendo um grupamento polar separado de um resíduo não polar, e que são também inibidores de cAK, incluem o carotenóide crocetina e a curcumina (Hasmeda e cols., 1999).

Kaminua e cols., (1997) demonstrou que a proteína quinase AMPc-dependente (PKA) está envolvida na regulação da expressão de citocinas e inclusive pode promover a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Yu e cols., 1998). α -Amirina é um potente inibidor competitivo das proteases tripsina e quimiotripsina, onde o bloqueio enzimático acontece por acomodação do núcleo triterpenóide dentro do sítio ativo de enzimas (Rajic e cols., 1999).

Isto nos permitiu sugerir que a AMI deve agir em algum evento celular que desencadeia a produção de $\text{TNF-}\alpha$, podendo ser em enzimas ou proteínas que codificam geneticamente a produção de $\text{TNF-}\alpha$. Como discutido anteriormente a amirina possui efeitos antiproliferativos o que contribui para uma redução no edema

após a 24^a hora, onde a participação de proliferação celular é mais intensa. Este efeito também é potencializado pela associação de doses baixas de amirina e talidomida, o que vem ratificar a tese de envolvimento de inibição de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α que, quando inibidas, diminuem a proliferação celular.

Amirina e a nocicepção

Segundo Besson (1997), a inflamação aguda ou crônica é um modelo de nocicepção e a pesquisa sobre dor inflamatória tem mostrado que mediadores inflamatórios podem gerar impulsos nociceptivos. Desse modo, foi estabelecido que a bradicinina e a 5-HT são capazes de excitar nociceptores cutâneos e a serotonina pode aumentar pronunciadamente a resposta de nocicepção à bradicinina (Lang e cols., 1990; Rueff e Dray, 1993).

Recentes descobertas apontam a contribuição de citocinas, inclusive o TNF- α , na geração e manutenção da hiperalgesia que acompanha a dor neuropática (Jungler e Sorkin, 2000). Também as prostaglandinas promovem a sensibilização de nociceptores pela bradicinina em alguns tecidos (Schaible e Schmidt, 1988). Além disso, foi demonstrado o papel de neuropeptídeos, especialmente a substância P na ativação da inflamação neurogênica (Steen e cols., 1996). A interação de todos esses mediadores torna o tratamento farmacológico da dor muito complexo.

O uso de fármacos antiinflamatórios com a finalidade de reduzir a inflamação resulta em alívio da dor por significativo período de tempo. Além disso, a maioria dos analgésicos não opióides, tais como inibidores de ciclooxigenases, também exercem efeito antiinflamatório (Payan e Katzung, 1995).

Considerando estes fatos e com base na atividade antiedematogênica manifestada pela AMI foi investigada sua propriedade analgésica. Ao utilizar testes de comportamento nociceptivo, impõe-se a necessidade de aplicar vários desses ensaios, diferentes quanto à qualidade, intensidade e duração do estímulo, para obter

um retrato o mais fiel possível das propriedades analgésicas de substâncias químicas estudadas (Tjolsen e cols., 1992). Os seguintes testes: contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, formalina e placa quente situam-se entre os mais comumente empregados com essa finalidade e por isso foram utilizados para determinar a atividade analgésica da AMI.

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi originalmente descrito por Wander Wende e Margolin (1956) para ratos e modificado por Koster e cols., (1959) para camundongos. O ácido acético provoca reação dolorosa, produzindo inflamação aguda na área peritoneal. Desse modo, não age por estimulação direta de receptores nociceptivos peritoneais, mas pela liberação de substância endógenas que excitam as terminações nervosas (Gyires e Torna, 1984). Foi demonstrado considerável aumento dos níveis de prostaglandinas E_2 e F_{2a} no fluido peritoneal, após a injeção de ácido acético e, portanto, o pronunciado efeito analgésico de fármacos similares a aspirina sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético pode ser explicado pelo bloqueio da síntese de prostaglandinas e conseqüente inibição no desenvolvimento da hiperalgesia. A morfina também se mostra eficaz contra as contorções induzidas por esse agente irritante (Deraedt e col., 1980; Gyires e Torna, 1984). A AMI administrada por via intraperitoneal foi capaz de inibir de modo significativo e dose-dependente, as contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos, com clara evidência de sua melhor eficácia por via intraperitoneal.

O teste de formalina foi introduzido por Dubuisson e Dennis (1977) para gatos e ratos e posteriormente adaptado por Hunskaar e cols., (1985) para camundongos. Esse teste permite avaliar como um animal responde a dor contínua e moderada causada por injúria tecidual. Devido a essa conexão com lesão tecidual, acredita-se que esse ensaio fornece um modelo de dor clínica mais válido do que aqueles com estímulo fásico térmico ou mecânico (Dubuisson e Dennis, 1977).

Um importante aspecto do teste de formalina em roedores consiste no fato de que esses animais manifestam duas fases distintas de comportamento

nociceptivo que parecem envolver estímulos diferentes. A primeira fase tem início imediatamente após a injeção de formalina, dura de 3 a 5 minutos e provavelmente resulta de direta estimulação química de nociceptores. Subseqüentemente, existe um período de 10 a 15 minutos durante o qual os animais exibem comportamento muito pouco sugestivo de nocicepção. A segunda fase começa de 15 a 20 minutos após a injeção de formalina, dura de 20 a 40 minutos e parece depender de processo inflamatório periférico e alterações no processamento central. Fármacos antiinflamatórios não esteroidais como, por exemplo, a indometacina inibem o comportamento nociceptivo durante a Segunda fase, enquanto que a primeira não é afetada (Rosland e cols., 1990). Os analgésicos narcóticos são capazes de inibir ambas as fases (Hunnskaar e Hole, 1987). Resultados experimentais indicaram que a substância P e bradicinina na fase inicial enquanto que a histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina estão envolvidas na fase tardia (Shibata e cols. 1989). De modo significativo e dose-dependente a AMI reduziu o comportamento nociceptivo dos animais predominantemente na segunda fase (o que evidencia um efeito relacionado com a inibição da reação inflamatória), mas também houve inibição significativa na primeira fase (resposta neurogênica). A naloxona, antagonista opióide, não exerceu influência sobre o efeito antinociceptivo da AMI, mas aboliu o da morfina, indicando que a atividade antinociceptiva da AMI parece não envolver a atividade de receptores opióides.

O teste da placa quente, desenvolvido há mais de cinquenta anos atrás por Woolfe e MacDonald (1944), consiste na aplicação de um estímulo de curta duração e alta intensidade que é detectado por terminações nervosas livres e transmitidos através de vias neuronais de condução. Esse ensaio envolve funções cerebrais superiores e consiste em uma resposta ao estímulo nociceptivo que é organizada ao nível supra-espinhal (Gardmark e cols., 1998). Analgésicos fracos, tais como o ácido acetilsalicílico e paracetamol, praticamente não exercem influência sobre a resposta no teste da placa quente (Tjolsen e cols., 1992). Esse teste tem sido largamente utilizado para medir a potência de opióides (Plone e cols., 1996).

O efeito da AMI foi manifestado depois de administrada por via oral e intraperitoneal, onde inibições máximas foram demonstradas na dose de 50 mg/Kg, i.p. Foi demonstrado que o efeito da AMI não foi revertido pela naloxona, confirmando que a antinocicepção é independente da participação do sistema opióide. A morfina (controle positivo) produziu efeito analgésico durante todo o período de duração do teste da placa quente.

Apesar de comprovado efeito sedativo e ansiolítico da AMI, que discutiremos mais tarde, a AMI demonstrou excelentes níveis de aumento nos limiares da nocicepção em todos os experimentos realizados, em várias concentrações e nas duas vias de administração testadas e em já se conhecendo a atividade antiinflamatória desta droga, podemos confirmar que a AMI exerce efeito antinociceptivo periférico e central onde mediadores da nocicepção são possivelmente inibidos.

Amirina e o Sistema Nervoso Central

Não existe relato na literatura acerca de estudos farmacológicos em nível de Sistema Nervoso Central envolvendo os triterpenos alfa e beta amirina, então foi analisada a possibilidade destas substâncias estarem envolvidas em alguma atividade na capacidade exploratória ou na coordenação motora de camundongos. Contudo, o éster da beta-amirina sob forma de palmitato foi estudado quanto a sua ação Central e o efeito foi comparado com drogas antidepressoras como mianserina e imipramina, onde foi concluído que este éster possui propriedades similares a mianserina o que pode sugerir uma ação sedativa (Ohizumi e cols., 1993). Em outro estudo o palmitato de beta-amirina apresenta-se como antidepressivo provavelmente por liberar norepinefrina recém-sintetizada de dentro das vesículas, ativando a atividade noradrenérgica (Ohizumi e cols., 1993).

O Campo Aberto é muito usado como medida de emocionalidade em roedores (Albonetti e Farabollini, 1984), e também para estudar os efeitos de ansiolíticos e outras classes de drogas no comportamento de animais submetidos a um novo ambiente (Diana e Sagratella, 1994). Embora seja ainda de difícil definição, o termo "atividade exploratória" é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só as respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas. Essas atividades já foram anteriormente descritas como exploração passiva e ativa, respectivamente, e equivalem aos comportamentos inspetivos e inquisitivos (Birke e Archer, 1983).

No rato de laboratório, os comportamentos que levam a uma ampliação das informações obtidas pelo animal incluem correr em círculos, cheirar (*sniffing*), levantar-se nas patas posteriores (*rearing*), movimentar as vibrissas, direcionar-se para um estímulo particular, entre outros. Outras espécies podem manipular ou até mesmo levar objetos à boca. Estudos psicológicos de atividade exploratória em animais têm se baseado na exposição do animal a uma alteração ambiental discreta e localizada ou no confinamento a um ambiente nunca experimentado anteriormente (Thinus-Blanc e cols., 1987).

No último caso, o novo ambiente pode ser um labirinto, um campo aberto ou outro tipo de aparelhagem. A adoção desse tipo de teste apresenta uma clara conveniência pela facilidade de registro comportamental, quando comparado ao estudo no ambiente natural. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que, no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, o movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória. Tipicamente, a taxa de ambulação, que envolve andar e correr, é mensurada através da contagem do número de seções do ambiente transpassadas pelo animal por exemplo, setores do assoalho de um campo aberto ou

braços de um labirinto. Esse tem sido um dos parâmetros mais utilizados, possivelmente devido à sua fácil mensuração (Thinus-Blanc e cols., 1987).

No entanto, Birke e Archer (1983) observaram, existir alguns problemas em se aceitar a premissa de que a locomoção necessariamente indica atividade exploratória. Segundo esse autor, um animal pode estar se movimentando em um ambiente desconhecido por outras razões como, por exemplo, numa tentativa de encontrar um via de escape. Atividade e investigação exploratória têm sido considerados comportamentos distintos a partir de estudos envolvendo manipulações fisiológicas do tipo injeção de agonistas dopaminérgicos e hipocampectomia. O'Keefe e Nadel (1978, *apud* Birke e Archer, 1983) sugeriram, com base em resultados obtidos em estudos com esse tipo de manipulação, que o efeito da lesão não é o de fazer com que os animais explorem mais, e sim os torna hiperativos.

Um outro exemplo de caso em que a hiperatividade leva a um aumento da taxa de ambulação sem resultar num aumento da exploração é apontado por Poucet e col. (1986): certos danos cerebrais como lesões no colículo superior ou no septo induzem hiperatividade em ratos sem que as respostas sejam tipicamente de exploração.

Em estudos com ratos usando diferentes tipos de campo aberto (Hine, 1995), foi demonstrado um aumento de locomoção em ratos de linhagens que geralmente apresentam uma maior emocionalidade. Nossos resultados mostraram uma redução dose-dependente na locomoção dos animais, sugerindo uma ação ansiolítica da AMI em camundongos. Isto também está de acordo com estudos anteriores, que mostraram redução da locomoção em campo aberto pelo clordiazepóxido e outras drogas que podem ter ação ansiolítica como, por exemplo, o propranolol (Angrini e cols., 1998). A Atividade máxima foi obtida na dose de 50 mg/Kg, i.p., onde nos três parâmetros avaliados (movimento exploratório, grooming e rearing) houve redução significativa em relação ao controle.

A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras (*rearing*) é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade desde que proposto por Lat (1963, *apud* Birke e Archer, 1983), uma vez que esse comportamento freqüentemente correlaciona-se com outras atividades como auto-limpeza corporal (*grooming*), defesa e reações sexuais. A aferição desse tipo de resposta é bastante simples, sendo necessário apenas o uso de um cronômetro para que se registre o número de vezes que o comportamento ocorre e o seu tempo de duração.

Alguns estudos relacionam o *rearing* como um aspecto de comportamento exploratório (Hine, 1995; Johansson e Ahlenius, 1989). Experimentos comportamentais usando agentes ansiolíticos mostram que estas drogas causam uma diminuição do *rearing* nos animais (Hughes, 1972; Stout e Weiss, 1994).

No presente estudo houve uma diminuição do *rearing* quando os animais foram tratados com AMI. Estes resultados são consistentes a relatos anteriores que observaram que ratos de linhagens mais estressadas mostravam altos escores de *rearing* em campo aberto que ratos de linhagens menos estressados (Hine, 1995), e também com outros estudos que mostraram reduções de *rearing* em campo aberto produzido por ansiolíticos (Gray, 1982).

No Teste do Rota Rod não houve nenhuma alteração significativa nos parâmetros analisados NQ (número de quedas da barra giratória) e TP (tempo de permanência na barra giratória), demonstrando que a AMI nas doses testadas e administradas em camundongos não altera a coordenação motora dos animais.

Desde a introdução do teste do Labirinto em Cruz Elevado (Handley e Mithani, 1984) e validação comportamental, fisiológica e farmacológica em 1985 por Pellow e colaboradores, o labirinto em cruz elevado tem sido um instrumento útil para a avaliação da ansiedade experimental no rato (Morato e Castrechini, 1989; File, 1993; Treit e cols., 1993a; Treit, 1985, 1994; Cruz e cols., 1994; Scorza e cols., 1996; Hogg, 1996; Morato e Brandão, 1996, 1997; Anseloni e Brandão, 1997;

Mendonça e Guimarães, 1998). Neste teste, pode ser observado em condições normais que ocorre uma exploração significativamente menos intensa (em termos de frequência de entradas e do tempo de permanência) nos braços abertos quando comparados aos braços fechados. Se os animais recebem injeções de drogas de efeito ansiolítico, aumentam tanto a frequência como o tempo de permanência nos braços abertos. No mesmo sentido, quando são administrados fármacos de efeito ansiogênico, a frequência e o tempo nesses braços diminui ainda mais do que nas condições normais (Handley e Mithani, 1984; Pellow e cols., 1985; Moser, 1989; File, 1990; Blanchard e cols., 1990; Wada e Fuyuka, 1991; Da Cunha e cols., 1992; Handley e McBlane, 1993; Rodgers e Cole, 1994; Andreatini e Leite, 1994; Anseloni e cols., 1995; Rodgers e cols., 1996; Graeff e cols., 1996; Fernandes e File, 1996; Matheus e Guimarães, 1997).

Além da contagem do número de entradas em cada tipo de braço e dos tempos de permanência nos mesmos, outras análises comportamentais podem ser realizadas. O labirinto em cruz elevado, devido ao fato de simular uma situação muito próxima às encontradas no ambiente natural do rato, assim como de não requerer aprendizagem prévia ou submissão a restrições alimentares ou de líquidos, permite avaliar de forma muito natural o comportamento espontâneo do rato. Assim, em 1994, Cruz e cols., baseados em trabalhos anteriores de Blanchard e cols. (1989), acrescentaram à análise tradicional de frequências de entradas e tempos de permanência, a análise de outros comportamentos tais como mergulhar a cabeça (*head dipping*), levantar-se (*rearing*), exploração dos extremos dos braços abertos e auto limpeza (*grooming*). De acordo com alguns autores (Lister, 1987; Rodgers e Johnson, 1995; Fernandes e File, 1996), o comportamento de mergulhar a cabeça pode ser considerado um indicador da atividade exploratória sendo, porém, uma medida afetada pela ansiedade. Assim, a frequência e o tempo gasto nessa atividade podem ser aumentados com a administração de ansiolíticos benzodiazepínicos (Cole e Rodgers, 1993). O comportamento de levantar-se consiste na posture bípede a rato, apoiando-se nas patas posteriores, estando ereto ou semi-arqueado. Esse

comportamento, junto com a quantidade de entradas nos braços fechados e a quantidade total de entradas, é considerado por alguns autores como um indicador da atividade motora (Cruz e cols.,1994).

O comportamento de limpar-se, composto por todos os movimentos de limpeza do corpo do animal com a língua, os dentes ou as patas dianteiras, não tem sido totalmente compreendido até o momento. Para alguns autores, existe uma relação entre a limpeza e a regulação da temperatura (Hainsworth, 1967). Outros autores têm relacionado a limpeza com situações conflitantes e inclusive frustração (McFarland, 1966; Jolles e cols.,1979; Spruijt e cols.,1992). A exploração dos extremos dos braços abertos é a entrada do sujeito no final desses braços. Esse comportamento de exploração das extremidades abertas é um indicador do nível de medo experimentado pelo sujeito no labirinto em cruz elevado. De fato, injeções de drogas com efeito ansiolítico ou ansiogênico induzem aumento ou diminuição, respectivamente, tanto da quantidade de visitas às extremidades, quanto do tempo de permanência nas mesmas. Dessa forma, os resultados de Cruz e cols.(1994), assim como os obtidos por Rodgers e Cole (1994), demonstraram a pertinência da utilização desses comportamentos para se obter medidas mais detalhadas do comportamento.

Algumas outras linhas de pesquisa sobre o comportamento exploratório estudaram as alterações induzidas por fatores externos, tais como a desnutrição (Santucci e cols., 1994; Almeida e cols., 1991, 1993, 1996), isolamento (Frussa-Filho e cols., 1991; Maisonnette e cols., 1993; Morato e Brandão, 1997), manipulação (Ambrogi-Lorenzini e cols., 1990; Igarashi e Takeshita, 1995; Hogg, 1996; Schmitt e Hiemke, 1998), aversão à situação experimental (Aitken, 1974; Treit e cols.,1993a; Griebel e cols.,1993; Guimarães e cols.,1993; Graeff e cols.,1996) ou restrição comportamental (Netto e Guimarães, 1996; Martijena e cols., 1997; Mendonça e Guimarães, 1998). Nesse sentido, não só tem sido encontrado que os efeitos achados para os fármacos ansiolíticos ou ansiogênicos, podem ser replicados pela modificação de condições ambientais, como também tem

sido encontrado que esse tipo de modificação pode interagir com os efeitos farmacológicos, potencializando ou diminuindo sua eficácia.

Embora existam alguns estudos sistemáticos do papel de diferentes estruturas cerebrais sobre o medo manifestado no labirinto em cruz elevado (Chopin e Briley, 1987; Kostowski e cols., 1989; Briley e cols., 1990; Audi e cols., 1991; Guimarães e cols., 1991; Itoh e cols., 1991; Da Cunha e cols., 1992; Critchley e cols., 1992; Russo e cols., 1993; Treit e cols., 1993b; Imperato e cols., 1994; Decker e cols., 1995; Monnier e Lalonde, 1995; Rodgers e Johnson 1995; Miyazaki e cols., 1995; Pesold e Treit, 1992, 1994, 1995, 1996; Menard e Treit, 1996; Padovan e cols., 1996; Thulier e cols., 1996; Graeff e cols., 1996; Rodgers e cols., 1996; Shoham e Emson, 1997; Hlinak e Krejei, 1998), ainda não foram determinadas em detalhe as interações entre as estruturas cerebrais e o comportamento exploratório. Na verdade, a maior parte dos estudos enfatiza certos aspectos do comportamento nesse teste, tais como o medo ou a locomoção.

O Labirinto em cruz elevado é certamente o modelo animal de ansiedade atualmente mais utilizado nas investigações dos substratos neurais da ansiedade e nos estudos sobre os mecanismos de ação de drogas que atuam nos transtornos da ansiedade. Este modelo foi primeiramente empregado por Handley e Mithani, 1984. Estas pesquisadoras observaram que ratos colocados no centro de um labirinto elevado, constituído por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços circundados lateralmente por paredes, demonstravam clara preferência pela exploração destes últimos.

A preferência pela exploração dos braços fechados em relação aos braços abertos de um labirinto já havia sido descrita por Montgomery, 1995, que utilizou labirinto em forma de Y e atribuiu esta preferência ao conflito gerado nos animais entre seus impulsos exploratórios e seus impulsos de medo. Os impulsos exploratórios seriam evocados com a mesma intensidade tanto nos braços fechados como nos abertos, enquanto os de medo seriam mais intensos nos braços abertos. A exposição dos ratos a situações naturalmente ameaçadoras a sua espécie, como

altura e espaços abertos, explicaria o maior medo pela exploração dos braços abertos.

Treit e cols, 1993, forneceram evidências de que a ausência de proteção lateral nos braços abertos seria mais importante do que a altura, no desencadeamento do medo no labirinto em cruz elevado. Ou seja, o labirinto é um modelo de ansiedade animal, baseado no medo inato que os roedores possuem de ficar em espaços abertos e elevados (Montgomery, 1995). Os ratos no labirinto preferem ficar nos braços fechados, e quando confinados em braços abertos, mostram manifestações comportamentais e fisiológicas indicativas de medo, tais como imobilidade, defecação e aumento de corticosteróides no plasma (Pellow e cols., 1985; Treit e cols., 1993).

Nos últimos anos o teste de labirinto é muito usado como um procedimento simples e rápido para detectar tanto efeitos ansiolíticos como ansiogênicos de drogas, utilizando ratos ou camundongos (Pellow e cols., 1985). Usualmente os animais gastam mais tempo, do total de tempo dispendido no ensaio, (5 minutos), nos braços fechados do labirinto do que nos braços abertos, local que induz ansiedade nos animais. Contudo, quando são administrados compostos ansiolíticos aos animais, estes gastam significativamente mais tempo nos braços abertos do que os animais do grupo controle. Os índices de ansiedade tradicional no teste do labirinto mostram uma boa sensibilidade às drogas ansiolíticas atuando no receptor gaba-benzodiazepínicos (Rodgers e cols., 1994). Contudo o tratamento com drogas agonistas serotoninérgicas produzem resultados inconsistentes no teste, como por exemplo, efeitos ansiolíticos (Kostowski e cols., 1992), ansiogênicos (Motta e cols., 1992) e até mesmo ausência de efeitos (Artaiz e cols., 1995). Tais efeitos inconsistentes com agonistas serotoninérgicos levaram alguns pesquisadores (Moser e cols., 1990) sugerir que o teste de labirinto é de alguma forma insensível a estes agentes.

Também foi observado que os efeitos ansiolíticos de drogas serotoninérgicas em modelos de ansiedade, são menores e mais variáveis que os

efeitos dos benzodiazepínicos (Green, 1991) e que alguns modelos podem até gerar respostas em direção oposta àquela prevista pela hipótese clássica.

Os benzodiazepínicos e os barbitúricos aumentam seletivamente o número de entradas e o tempo gasto de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto (Pellow e File, 1986), resultado indicativo de efeito ansiolítico.

Neste estudo, aumentaram significativamente os parâmetros analisados, NEBA (Número de Entradas nos Braços Abertos) e TPBA (Tempo de Permanência nos Braços Abertos) com a AMI na concentração de 50 mg/Kg, i.p., evidenciando um efeito ansiolítico da AMI.

Amirina e agregação plaquetária

Tendo em vista suas ações antiedematogênica e antinociceptiva demonstradas no presente estudo, foi avaliado o possível envolvimento da AMI na agregação de plaquetas de sangue humano.

Visto que alguns compostos atuam como antagonistas de receptor, inibindo especificamente a ativação plaquetária induzida por um dado agonista, como por exemplo: a frangulina B (Teng e cols., 1993) e clopidogrel, antagonista de receptor do ADP (Gachet, 1995), a possível especificidade de ação antiagregante plaquetária da AMI foi investigada em PRP obtido de amostras de sangue humano, o efeito da AMI sobre a resposta de plaquetas aos agentes agregantes, ADP, colágeno e ácido araquidônico foi determinado *in vitro*.

O ADP desenvolve um papel chave na hemostasia como a estimulação da agregação plaquetária, e quando secretada dos grânulos densos de plaquetas, ativadas pelo próprio ADP e por outros agonistas, potencia a resposta agregante induzida por outros agentes (Ohlmann e cols., 2000). *In vitro*, em PRP, o ADP pode induzir os dois tipos de agregação, primária (reversível), em baixas concentrações

(de 0,1 a 0,5 μM) e secundária (irreversível), em concentrações elevadas, que variam de 2 a 5 μM (Yardumian, 1986).

A ativação plaquetária por ADP resulta em alteração de forma, agregação, produção de TXA_2 e secreção dos grânulos. Além disso, induz a inibição de adenililciclase, previamente estimulada por PGI_2 e PGE_1 , mobilização de cálcio de seus estoques no citoplasma e o rápido influxo de cálcio (Jin e cols., 1998). A ativação plaquetária induzida por ADP envolve pelo menos dois tipos de receptores. O receptor purinérgico P2Y_1 , o qual é acoplado a proteína $\text{G}\alpha_q$ e causa conseqüente mobilização de cálcio intracelular é responsável pela mudança de forma da plaqueta que inicia a agregação, enquanto o outro, o P2Y_{12} acoplado a inibição da adenilciclase, é responsável pela amplificação e conclusão da resposta, um terceiro receptor, o P2X_1 que medeia fluxos iônicos foi demonstrado ser mais sensível ao ATP. Recentes trabalhos evidenciaram que a ticlopidina e clopidrogrel agem inibindo a ação do ADP no receptor P2Y_{12} . (Nurden e cols., 1995; Clifford e cols., 1998; Ohlmann e cols., 2000; Hollopeter e cols., 2001; Gachet, 2001).

O colágeno presente na região subendotelial, depois de uma lesão, é exposto à superfície da parede vascular e exerce um importante papel na ativação de plaquetas, evento que inicia o processo de reparo da lesão (Clemetson, 1999). O colágeno, tanto monomérico como fibrilar, induz a adesão, mas somente a adesão ao colágeno fibrilar resulta em secreção. Os quatro tipos de colágeno fibrilar encontrado no subendotélio, I e II (colágeno intersticial), IV e V (colágeno de membrana basal), podem induzir a agregação, mas apenas os tipos I, III e IV sustentam a adesão (Siess, 1989).

Esforços para identificar o componente da membrana plasmática responsável pela adesão inicial de plaquetas as fibrilas de colágeno, tem resultado em várias respostas. Como o colágeno pode interagir com diversas proteínas, não causa surpresa o fato de que uma grande variedade de prováveis receptores tenham sido descritos para esse agonista (Colman, 1991).

Recentemente, a glicoproteína (Ia/IIa) e glicoproteína VI (GPVI) tem recebido maior atenção. Foi demonstrado que GPVI é especificamente necessária para a ativação de plaquetas humanas por colágeno e o estímulo pelo colágeno induz a fosforilação da tirosina da cadeia gama do receptor Fc (FcR), um receptor de colágeno presente na plaqueta (Moroi e cols., 1989; Gibbins e cols., 1997).

O colágeno é conhecido por estimular a fosforilação da proteína tirosina e aumentar o cálcio intracelular (Hubbard e cols., 2003), também foi demonstrado que a agregação de plaquetas induzida por colágeno é associado a um aumento de peróxido de hidrogênio que age como segundo mensageiro, por estimulação do ácido araquidônico e ativação da fosfolipase C (Pignatelli e cols., 1998).

A AMI por nós estudada foi capaz de inibir a agregação induzida por todos os agonistas anteriormente mencionados, que indica sua atuação numa etapa do processo de ativação plaquetária comum a esses agentes. Contudo, de modo significativo, a AMI mostrou-se mais potente frente ao ADP, onde o efeito máximo foi obtido com a AMI numa concentração de 150 μ M. Nestas condições foi observada uma inibição de 64% em relação ao controle. Na presença de ADP ou colágeno, AMI produziu um efeito do tipo dose-dependente, até 150 μ M para o ADP e 100 μ M para o colágeno, pois a partir destas concentrações o efeito antiagregante não foi sofreu grandes diferenças em relação a estas doses.

O ácido araquidônico é um potente indutor da agregação de plaquetas *in vitro*, e sua atividade é devida a conversão de metabólitos biologicamente ativos, as prostaglandinas, endoperóxidos e tromboxano A₂, os quais podem agir nos mesmos receptores (Veza e cols., 2002). O ácido araquidônico é metabolizado através da via cicloxigenase e tromboxano sintase, que produz o TXA₂, um potente vasoconstritor e indutor de secreção e agregação (Siess, 1989; Fitzgerald, 1991; Okwu e cols., 1994).

Estudos farmacológicos sugeriram a presença de dois subtipos de receptor do TXA₂ na plaqueta com funções distintas. Sendo responsáveis pela

A AMI na presença de ácido araquidônico como agonista, inibiu a agregação variando entre 15 a 27% mostrando-se pouco eficaz na inibição da agregação plaquetária induzida por este agonista e não foi maior que o efeito observado com o ADP e colágeno, sugerindo que a AMI causa pouca interferência nos mecanismos de agregação envolvendo os metabólitos do ácido araquidônico, como endoperóxidos e tromboxano A_2 .

Investigando a influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária foi observado que com dez minutos a AMI já havia produzido seu efeito inibitório máximo. Por isso, esse período de tempo de incubação foi utilizado em todos os experimentos.

O ácido acetilsalicílico (AAS), bloqueador da ciclooxigenase, inibe a secreção e agregação produzidas por muitos agonistas de forma irreversível, o que denota a atuação do TXA_2 como mediador dessas respostas plaquetárias (Siess, 1989; Schror, 1997). O ácido acetilsalicílico bloqueia também a agregação secundária induzida por trombina, colágeno, ADP e ácido araquidônico, devido a inibição da produção plaquetária de diacilglicerol, sendo este efeito menos duradouro que a ação sobre a ciclooxigenase e é dependente da dose (Ackerman e Newman, 1990).

A inibição da agregação plaquetária pelo ácido acetilsalicílico induzido por colágeno produz efeitos máximos com doses de AAS variando entre 80 a 160 mg/dia, enquanto que utilizando o agonista ADP, o ácido acetilsalicílico mostrou-se mais sensível promovendo uma inibição plaquetária de forma dose-dependente a partir de 40 até 1300 mg/dia em sangue humano de pacientes pré-tratados (Bitanga e cols., 2002).

O efeito produzido pela AMI sobre a função plaquetária após sua associação com o ácido acetilsalicílico foi estudado utilizando PRP humano, *in vitro*. De acordo com os resultados obtidos, a AMI potencializou a inibição da

agregação produzida pelo ácido acetilsalicílico principalmente frente ao ADP. Embora utilizando o AA como agonista, observamos que a AMI não potencializa este efeito, pois como mostrado nos resultados, a AMI desempenha uma fraca atividade antiagregante plaquetária frente ao agonista AA.

Na presença de colágeno, a AMI que demonstrou uma boa resposta antiagregante plaquetária, apenas produz uma discreta potencialização desta atividade na presença do AAS. De modo significativo, a AMI associada ao ácido acetilsalicílico mostrou-se mais potente frente ao ADP em relação aos demais agonistas, o que sugere um mecanismo de ação da AMI envolvendo uma maior sensibilização na ativação de receptores de ADP.

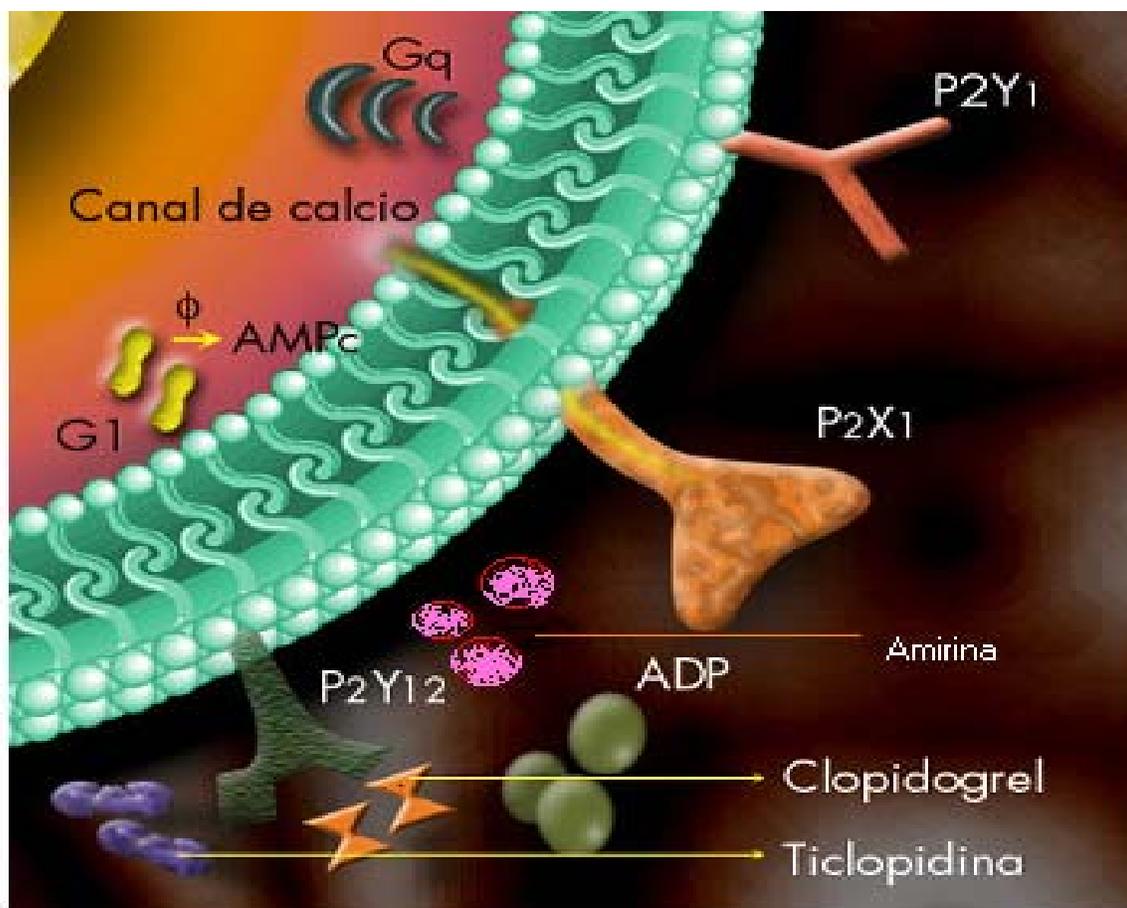


Figura 32 - O receptor P2Y₁ se une com proteínas da família G_q aumentando assim a concentração de cálcio intraplaquetário. P2X₁ funciona como um canal de cálcio independente. P2Y₁₂ ao unir-se com G_i inibe a produção de AMP cíclico. A amirina provavelmente interfere na ação agonista do ADP em nível de receptores, na agregação plaquetária.

Fonte: <http://www.iladiba.com.co/noticias/2001/01/ene 17-1.asp>.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os estudos realizados com a mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI), obtida do *Protium heptaphyllum*, nos permitiram estabelecer as seguintes conclusões:

✂ AMI inibiu significativamente a nocicepção em modelos experimentais, utilizando camundongos, onde o efeito antinociceptivo foi evidenciado tanto em nível periférico como em nível central. O efeito analgésico central da AMI parece não envolver os receptores opióides, pois a atividade da AMI não foi revertida na presença de naloxona, podendo ocorrer através da inibição de mediadores algogênicos endógenos tais como bradicinina, histamina, serotonina e prostaglandinas;

✂ AMI diminui significativamente o edema de pata nos modelos experimentais de carragenina e dextrano, utilizando camundongos e ratos, o que comprova sua ação antiedematogênica.

✂ A indometacina não potencializou a ação da AMI, o que vem a comprovar que o mecanismo de ação desta, não se dá preferencialmente por inibição de cicloxigenases, entretanto a talidomida potencializou o efeito antiinflamatório da AMI, sugerindo que o mecanismo de ação de AMI ocorre através de inibição de citocinas como TNF- α .

✂ AMI foi eficaz para o tratamento de um processo inflamatório (efeito curativo) com formação de edema, utilizando dois modelos experimentais (carragenina e dextrano) em camundongos.

✎ AMI provocou uma redução na atividade locomotora e na frequência de *rearing* e *grooming*, indicando efeitos sedativo e ansiolítico, sendo o último comprovado no teste de labirinto em cruz elevado na dose de 50 mg/kg, i.p, sem afetar a coordenação motora dos camundongos no teste do rota rod, comprovando que a diminuição na atividade locomotora e exploratória é devido as suas ações sedativa e ansiolítica.

✎ AMI inibe de modo significativo a agregação de plaquetas humanas induzidas principalmente pelos agonistas ADP e colágeno e de forma menos intensa com o ácido araquidônico em PRP, *in vitro*. Isso indica que a AMI, provavelmente atua numa etapa do processo de ativação plaquetária que é comum a esses agentes agregantes, mas preferencialmente ao ADP e colágeno.

✎ AMI não potencializa o efeito do AAS frente ao colágeno e AA como agonistas, sugerindo que o mecanismo de ação da AMI parece não envolver inibição de ciclooxigenases, mas potencializa fortemente o efeito do AAS quando o agonista utilizado é o ADP, o que sugere um mecanismo de ação por inibição de receptores que estejam relacionados com a ativação da agregação plaquetária pelo ADP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, R.H.; NEWMAN, K.L. Incomplete end-point effects in patients on aspirin compounds. **Ann Neurol**; v.28, p:224, 1990.

AHL, A. S. The role of vibrissae in behavior: a status review. **Veterinary Research Communications**, v. 10, p. 245-268, 1986.

AITKEN, P. Aversive stimulation and rats preference for areas differing in novelty-value and brightness. **Animal Behavior**, v. 22, p. 731-734, 1974.

AKARASEREENONT, P.; BAKHLE, Y.S.; THIEMERMANN, C.; VANE, J.R. Cytokine – mediated induction of cyclooxygenase-2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopolysacaride. **Br. J. Pharmacol.**, v.115, p.401 – 408, 1995.

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1255-1260, 1996.

ALBONETTI, M.E.; FARABOLLINI, F. Social stress by repeated defeat: Effects of social behavior and emotionality, **Behav. Brain Res.**, v. 62, p. 187-193, 1984.

ALMEIDA, S. S.; DE OLIVEIRA, L.M.; GRAEFF, F. G. Early life malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 513-518, 1991.

AMBROGI-LORENZINI, C.; BUCHERELLI, C.; FALCHINI, S.; GUIACHETTI, A.; RASSONI, G. The rats right-left preference during free exploration of a multiple Y-maze. **Physiology and Behavior**, v. 48, p. 175-177, 1990.

ANDREATINI, R.; LEITE, J. R. The effect of corticosterone in rats submitted to the elevated plus-maze and to pentylentetrazol-induced convulsions. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 18, p. 533-540, 1997.

ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPARD, R. A. Effects of propranolol, pCAP, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacol. Biochem. Beh.**, v. 59, p. 387-397, 1998.

ANSELONI, V. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavioral Pharmacology**, v. 8, p. 533-540, 1997.

ANSELONI, V. Z.; MOTTA, V.; LIMA, G.; BRANDÃO, M. L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus-maze constructed with transparent walls. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 597-601, 1995.

ARCHER, J. – Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ARTAIZ, I.; ROMERO, G.; ZASPE, A.; MONGE, A.; CALDERÓ, J. M.; ROCA, J.; LASHERAS, B.; DEL RIO, J. The pharmacology of VA21B7: na atypical 5-HT₃ receptor antagonist with anxiolytic-like properties in animal models. **Psychopharmacology (Berlin)**, v. 117, p. 137-148, 1995.

AUDI, E. A.; DE OLIVEIRA, R. M. W.; GRAEFF, F. G. Microinjection of propranolol into the dorsal periaqueductal gray causes na anxiolytic effect in the elevated plus-maze antagonized by Ritanscrine. **Pharmacology**, v. 105, p. 553-557, 1991.

BADIMON L.; BADIMON J.J.; FUSTER V. Thrombogenesis and inhibition of platelet aggregation. Experimental aspects and future approaches. **Z Cardiol.**, v. 79, p. 133-145, 1990.

BANDEIRA, P.N. “Contribuição ao Estudo Químico de Plantas do Nordeste Brasileiro – *Protium heptaphyllum* March. e *Protium tenuifolium* Engl.”, **Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica**, Fortaleza – CE, 2003.

BARRETT, J.E.; VANOVER, K.E. 5-HT_{1A} receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: Models, mechanisms and future directions. **Psychopharmacology (Berlin)**, v.112, p.1-12, 1993.

BARRIE, A.; DANIEL, J.L.; SMITH, B. Mechanism of platelet activation and inhibition. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v.4, n.1, p.1-26. 1990.

BECKER, A.; GRECKSEH, G. Illumination has no effect on rats behavior in the elevated plus-maze. **Physiology and Behavior**, v. 59, p. 1175-1177, 1996.

BESSON, J. M.; The complexity of phisiopharmacology aspects of pain. **Drugs**, v.53, Suppl.2, p.1-9, 1997.

BIRKE, L.I.A E ARCHER, J. Some issues and problems in the study of animal exploration. **Exploration in animals and humans**. University Press, Cambridge. 279p., 1983.

BITANGA, E.S.; GAN, R.; TELEG, R.A.; FLORENTO, L. Effect of increasing doses of aspirin on platelet aggregation among stroke patients. **Cerebrovascular Diseases**, v.14, n.3-4, p. 252-255, 2002.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R.J; TOM, P.; RODGERS, R. J. Diazepam changes risk assessment in na anxiety/defense test battery. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 511-518, 1990.

BLANCHARD, D.C.; HORI, K.; RODGERS, R. J.; HENDRIC, C. A.; BLANCHARD, R. J. Attenuation of defensive threat and attack in wild rats (*Rattus rattus*) by benzodiazepines. **Psychopharmacology**, v. 97, p. 392-401, 1989.

BORN, G.V.R.; CROSS, M.J. The aggregation of blood platelets. **J. Physiol.**, v.168, p.178-195, 1963.

BRASS, L.F.; HOXIE, J.A.; KIEBER-EMMONS, T.; MANNING, D.R.; PONCZ, M.; WOOLKALIS, M. Agonist receptors and G proteins as mediators of platelet activation, **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.344, p.17-36, 1993.

BRILEY, M.; CHOPIN, P.; MORET, C. Effects of serotonergic lesions on "anxious" behavior measured in the elevated plus-maze in the rat. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 187-189, 1990.

BRUNE, B.; VON APPEN, F.; ULLRICH, V. Oxidative stress in platelets. In: SIES, H. **Oxidative Stress: oxidants and antioxidants**. New York: Academic Press, p. 421-443, 1991.

CHARLIER, C.; MICHAUX, C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.38, p. 645-659, 2003.

CHAUDHARI, A.; CHATURVERDI, A.K.; SURENDRA, S.; PARMAR, S.S.; BRUMLEVE, S.J. Antiproteolytic activity of amylin acetates, **Res. Commun. Chem. Phatol. Pharmacol.**, v.7, p. 205-208, 1974.

CHENG, Z.J.; FINCKENBERG, P.; LOUHELAINEN, M.; MERASTO, S.; TIKKANEN, I.; VAPAATALO, H.; MERVAALA, E.M.A. Cardiovascular and renal effects of cyclooxygenase inhibition in transgenic rats harboring mouse renin-2

gene (TGR[mREN2]27), **European Journal of Pharmacology**, v. 461, p.159-169, 2003.

CHOPIN, P.; BRYLEY, M. Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify 5-HT neurotransmission. **Trends in the Pharmacological Sciences**, v. 8, p. 383-388. 1987.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.24, n.2, p.91-94, 2003.

CLEMETSON, k. j. Platelet collagen receptors: a new target for inhibition. **Haemostasis**, v. 29, n. 1, p. 16 – 26, 1999.

CLIFFORD, E.E.; PARKER, K; HUMPHRIES; B.D.; KERTESY, S.B.; DUBYAK, G.R. The P2X₁ receptor, an adenosine triphosphate-gated cation channel, is expressed in human platelets but not in human blood leukocytes. **Blood**. v.91, p.3172–3181, 1998.

COLE, J.C.; RODGERS, R. J. An ethological analysis of the effects of chordiazepoxide and bretazenil (Ro-16-6028) in the murine elevated plus-maze. **Behavioral Pharmacology**, v. 4, p. 573-580, 1993.

COLMAN, R. W. Receptors that activate platelets. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** V. 197, n. 3, p. 242-248, 1991.

CORRAL, L.G.; KAPLAN, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. **Ann. Rheum. Dis.**, v.58, s.1, p.1107-1113, 1999.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**, Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.1, p.82, 1984.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**, 5^a Ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 773-877, 1994.

CRITEHLEY, M.A.E; NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L.; Actions and some interactions of 5-HT_{1A} in the elevated x-maze and effects of dorsal raphe lesions. **Psychopharmacology**, v. 106, p. 171-179, 1992.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 171-179, 1994.

CRUZ, A. P.M., ZANGROSSI, H. & GRAEFF, F.G. Psicobiologia da ansiedade. **Psicoterapia comportamental e cognitiva: pesquisa, prática, aplicações e problemas**. Campinas: Editorial Psy, p.301-312, 1995.

CRUZ, A.P.M., ZANGROSSI, H., GRAEFF, F.G. & LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v.13, n.3, p. 269-278,1997.

DA CUNHA, C.; LEVI, M.; WOLFMAN, C. KOYA, R. IZQUIERDO, I.; MEDINA, I. I. I. Effect of various training procedures on performance in na elevated plus-maze: Possible relation with brain regional levels of benzodiazepine – like molecules. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 43, p. 677-681, 1992.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects, **Eur. J. Med. Chem.**, v.36, p.109-126, 2000.

DE MIRANDA, A.L.; SILVA, J.R.; REZENDE, C.M.; NEVES, J.S.; PARRINI, S.C.; PINHEIRO, M.L.; CORDEIRO, M.C.; TAMBORINI, E.; PINTO, A.C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*, **Planta Medica**, v.66, n.3, p.284-286, 2000.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLÉE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and it's inhibition. **Europ. JN. Pharmacol.**, v. 61, p. 17-24, 1980.

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

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **J. Pharm. Pharmacol.**, V.23, n.4, p.297-298, 1971.

DIANA, G.; SAGRATELLA, S. Different capability of N-Methyl-D-Aspartate antagonist to affect locomotor/exploratory activity of mice in computerized online open field test, **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.48, p.291-295, 1994.

DORN, G. W. II Distinct platelet thromboxane A₂/ prostaglandin H₂ receptor subtypes. A radioligand binding study of human platelets. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 1883 – 1891, 1989.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of the morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, v. 4, p.161-174, 1977.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J.Amer. Pharm. Assoc.*, v.46, p.208-210. 1957.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and Dithienylbutylamines, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.107, p.385-393, 1953.

EDER, J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? *Tips*. V.18. p. 319-322, 1997.

FASMER, O.B.; BERGE, O.G.; HOLE, K. Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6-dihydroxytryptamine – different effects in the formalin and tail flick test, *Neuropharmacology*, v.24, p.729-734, 1985.

FELDMANN, M.; MAINI, N.R. Discovery of TNFalpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies. *Joint Bone Spine*, v.69, p. 12-18, 2002.

FERNANDES, C.; FILE, S. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 54, p. 31-40, 1996.

FEUERSTEIN, G.; HALLENBECK, J.M. Prostaglandins, leukotrienes and platelet-activating factor in shock, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.27, p.301-313, 1987.

FILE, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research*, v. 58, p. 199-202, 1993.

FITZGERALD, G.A. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists, *Am. J. Cardiol.*, v.68, n.7, p.11B-15B, 1991.

FLEISCHMANN, R.; SHEALY, D. Developing a new generation of TNFalpha antagonist for the treatment of rheumatoid arthritis. *Mol. Intervent.*, v.3, p. 310-318, 2003.

FRISCHKORN, C.G.B.; FRISCHKORN, H.E. Cercaricidal Activity of Some Essencial Oils of Plants from Brazil, *Naturwissenschaften*, v.65, p.480-483, 1978.

GACHET C. ADP receptors of platelets and their inhibition. **Thromb Haemost.**, v.86, p. 222–232, 2001.

GACHET, C.; CATTANEO, M.; OHLMANN, P.; HECHLER, B.; LECCHI, A.; CHEVALIER, J.; CASSEL, D.; MANNUCI, P. M.; CAZENAVE, J. P. Purinoceptores on blood platelets : further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors. **Br. J. Haematol.**, v. 91, p. 434-444, 1995.

GARDMARK, M., HÖGLUND, A. U., HAMMARLUND-UDENAES, M. Aspects on tail-flick, hot-plate and electrical stimulation tests for morphine antinociception. **Pharmacology & Toxicology**, v. 83, p. 252-258, 1998.

GERRARD J.M.; WHITE J.G. Prostaglandins and thromboxanes: Middlemen modulating platelet function in hemostasis and thrombosis, **Prog Hemost. Tromb.**, v.4, p.87-125, 1978.

GIBBINS, J. M.; OKUMA, M.; FARNDALE, R., BARNES, M.; WATSON, S. P. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma – chain. **FEBS Lett.**, v. 413, n. 2, p. 255 - 259, 1997.

GOMEZ, M.A.; SAENZ, M.T.; GARCIA, M.D.; AHUMADA, M.C.; DE LA PUERTA, R. Cytostatic activity against Hep-2 cells of methanol extracts from *Viscum cruciatum* Sieber parasitic on *Crataegus monogyna* Jacq. and two isolated principles, **Phytotherapy Research**, p. 240 –242, 1997.

GRAEFF, F.G. & SHOENFELD, R.I. (1970). Tryptamine mechanisms in punished and non punished behavior. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v.173, p. 277-283, 1970.

GRAEFF, F.G., GUIMARÃES, F.S., DE ANDRADE, T.G. & DEAKIN, J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.54, n. 1, p. 129-141, 1996.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F. S.; DE ANDRADE, T.C.; DEAKIN J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 129-141, 1996.

GRAY, J. A. **The neuropsychology of anxiety**. Oxford: Oxford University Press, 1982.

GREEN, S. Benzodiazepines, putative anxiolytics and animal models of anxiety. **Trends Neurosc.**, v. 14, p. 101-104, 1991.

GRIEBEL, G.; MORCAU, J. L.; JENK, F.; MARTIN, J. R.; MISSLIN, R. Some critical determinants of the behavior of rats in the elevated plus-maze. **Behavioral Processes**, v. 29, p. 37-48, 1993.

GUIMARÃES, A.C., “Estudo químico e biológico das folhas de *Protium strumosum* (DALY), *Protium grandifolium* (ENGL), *Protium llewelynii* (MACBR), *Protium hebetatum* (DALY) e *Protium altsonii* (SANDW).”, 98F, **Tese (Mestrado em Química Orgânica), Universidade do Amazonas – UA**, Manaus – AM, 1997.

GUIMARÃES, F. S.; CAROBREZ, A. P.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 91-94, 1991.

GUIMARÃES, F. S.; DEL-BEL, E. A.; PADOVAN, C. M.; NETTO, S. M; DE ALMEIDA, R. T. hippocampal 5- HT1A receptors and consolidation of stressful memories. **Behavioral Brain research**, v. 58, p. 133-139, 1993.

GYIRES, K.; TORNA, Z. The use of the writhing test in mice for screening different types of analgesics. **Arch. Int. Pharmacodyn.** V.267, p.131-140, 1984.

HAINSWORTH, F. R. Saliva spreading activity and body temperature regulation in the rat. **American Journal of Physiology**, v. 212, p. 1288-1292, 1967.

HANDLEY, S. & MCBLANE, J.W. 5-HT drugs in animal models of anxiety. **Psychopharmacology**, v. 112, p.13-20, 1993.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha2-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol.**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of “fear” motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives in Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HANTGAN R.; HINDRIKS C.; TAYLOR R.; SIXMA J.; DE GROOT P. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood, **Blood**, v.76, n.2, p. 345-353, 1990.

HASMEDA, M.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; POLYA, G.M. Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids, **Planta Medica**, v.65, n.1, p.14-18, 1999.

HENRIQUES, M.G.M.O. Estudo da reação inflamatória induzida por carragenina em camundongos. **Instituto Oswaldo Cruz. Tese de Doutorado**. Williams, Tymoithy J. (Orientador). XVI, p.160, 1993.

HERMAN, A.G. Rationale for the combination of anti-aggregating drugs, **Thromb. Res.**, v.92, p.S17-S21, 1998.

HIIRSIJÄRVI, P.; VALIAHO, T. Effects of gentling on open-field behaviour of Wistar rats in fear-evoking test situation. **Laboratory Animals**, v. 29, p. 380-384, 1995.

HINE, B. Differential open-field in HAS and LAS rats, **Physiol. Behav.**, v.57, p.301-306, 1995.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 21-30, 1996.

HOLLAND, T.A.; MIKOS, A.G. Advances in drug delivery for articular cartilage, **Journal of Controlled Release**, v.86, p.1-14, 2003.

HOLLOPETER, G; JANTZEN, H.M; VINCENT, D; LI, G; ENGLAND. L; RAMAKRISHNAN, V; YANG, R.B; NURDEN, P; NURDEN, A,T; JULIUS, D. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. **Nature**; v.409, p.202-207, 2001.

HOYER, D. & MARTIN, G. 5-HT receptor classification and nomenclature towards a harmonization with the human genome. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 4-5, p. 419-428, 1997.

HUBBARD, G. P.; STEVENS, J. M.; CICMIL, M.; SAGE, T.; JORDAN, P. A.; WILLIAMS, C. M.; LOVEGROVE, J. A; GIBBINS, J. M. Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. **J. Thromb Haemost**, v. 1, n. 5, p. 1079-1088, 2003.

HUGUES, R. N. Clordiazepoxide-modified exploration in rats. **Psychopharmacology (Berlin)**, v. 24, p. 462-469; 1972.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p.69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. the formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur. J. Pharmacol.**, v.211, n.2, p.177-182, 1992.

ICFAMADAS. Distúrbios funcionais plaquetários hereditários. <http://www.icfamadas.hpg.ig.com.br/disturbios-funcionais-plaquetarios.html>. Rio de Janeiro. Acessado em 11/06/2004.

ICFAMADAS. Hemostasia. <http://www.icfamadas.hpg.ig.com.br/hemostasia.html>. Rio de Janeiro. Acessado em 11/06/2004.

IGARASHI, E.; TAKESHITA, S. effects of illumination and handling upon rat open-field activity. **Physiology and Behavior**, v. 57, p. 699-703, 1995.

ILADIBA.COM. Medicina para el medico de siglo XXI. Identificado nuevo receptor plaquetario. ISSN. 1657 -5628. <http://www.iladiba.com.co/noticias/2001/01/ene17-1.asp>. Acessado em 11/06/2004.

ITOH, J.; NABESHIMA, T.; KAMEYAMA, T. Utility of na elevated plus-maze for dissociation of amnesie and behavioral effects of drug in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 194, p. 71-76, 1991.

JIN, J.; DANIEL, J. L.; KUNAPULI, S. P. Molecular basis for ADP – induced platelet activation. II. The P_{2Y1} receptor mediates ADP – induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 4, p. 2030 – 2034, 1998.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involviment of 5-HT1A receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **J. Psychopharmacol.**, v. 3, p. 32-35; 1989.

JOLLES, J.; ROMPA-BARENDREGT J.; GISPEN, H. W. Novelty and grooming behavior in the rat. **Behavioral and Neural Biology**, v. 25, p. 563-572, 1979.

JUNGLER, H.; SORKIN, L.S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF-alpha. **Pain**, v. 85, p.145-151, 2000.

KAMINUA, O.; MORI, A.; OGAWA, K.; WADA, K.; KIKKAWA, H.; NAITO, K.; SUKO, M.; OKUDAIRA, H. Two distinct effects of cyclic AMP on IL-5 production by antigen-specific human T cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.283, p.345-349, 1997.

KEIFER, J.A.; GUTTRIDGE, D.C.; ASHBURNER, B.P., BALDWIN, A.S. Inhibition of NF-kappaB activity by thalidomide through sup Ikappa B kinase activity. *J.Biol. Chem.*, v.22, p. 382-387, 2001.

KIEFFER U.; PHILLIPS D.R. Platelet membrane glycoproteins: Functions in cellular interactions, *Ann. Ver. Cell. Biol.*, v.6, p. 329-357, 1990.

KLAUSNER, J.; FREEDMAN, V., KAPLAN, G. Thalidomide as an inhibitor of anti-TNF alpha: implications for clinical use. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v. 81, p. 219-223, 1996.

KOSAKA, T.; MIYATA, A.; IHARA, H.; HARA, S.; SUGIMOTO, T.; TAKEDA, O.; TAKAHASHI, E.; TANABE, T. Characterization of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase-2, *Eur. J. Biochem.*, v.221, p.889-897, 1994.

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

KOSTOWSKI, W.; DYR, W.; KRZASCIK, P.; JARBE, T.; ARCHER, T. 5-Hydroxytryptamine 1^A receptor agonists in animal models of depression and anxiety. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 71, p. 24-30, 1992.

KOSTOWSKI, W.; PLAZNIK. A.; STEFANSKI, R. Intra-hippocampal buspirone in animal models of anxiety. *European Journal of Pharmacology*, v. 186, p. 393-396, 1989.

KROGH, R.; KROTH, R.; BERTI, C.; MADEIRA, A.O.; SOUZA, M.M.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R.A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., *Pharmazie.*, v.54, n.6, p.464-466, 1999.

KROLL, M.H.; SCHAFER, A.I. Biochemical mechanisms of platelet activation, **The Journal of the American Society of Hematology**, v.74, n.4, p.1181-1195, 1998.

KWEIFIO-OKAI, G.; BIRD, D.; FIELD, B.; AMBROSE, R.; CARROL, A.R.; SMITH, P.; VALDES, R. Anti-inflammatory activity of a *Ghanaian* antiarthritic herbal preparation: III., **J. Ethnopharmacology**, v.46, n.1, p.7 –15, 1995.

KWEIFIO-OKAI, G.; DE MUNK, F.; RUMBLE, B.A.; MACRIDES, T.A.; CROPLEY, M. Antiarthritic mechanism of amyrin triterpenes, **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, v.85, n.1, p.45-55, 1994.

KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.A. Antilipoxygenase activity of amyrin triterpenes, **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v.78, n.3, p.367-372, 1992.

LAFFITTE E.; REVUZ, J. Thalidomide. **Ann. Dermatol. Venereol.**,v. 127, p. 603-613, 2000.

LANG, E.; NOVAK, A.; REEH, P.W.; HANDWERKER, H.O. Chemosensitivity of fine afferents from rat skin *in vitro*. **J. Neurophysiol.**, v.63, p.887-901, 1990.

LEFKOVITS, J.; PLOW, E.F.; TOPOL, E.J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine, **N. Engl. J. Med.**, p.1553-1559, 1995.

LING, H.C.; KING, M.L.; CHEN, C.F.; HSU, K.P.; SU, M.H.; LIN, M.H. Structure activity relationship of some triterpenoid and their derivatives as anticancer agents, **Chin Med J.**, v.29, p.308-315, 1982.

LISTER, R. G. Interaction of RO15-4513 with diazepam, sodium pentobarbital and ethanol in a hole board test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 28, p. 75-79, 1987.

LORENZI, H., Árvores Brasileiras. **Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, 1^a ed, São Paulo, Ed Plantarum Ltda, p.76, 1992.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclitriterpenoids – A compilation and some salient features, **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1517-1575, 1994.

MAHATO, S.B.; NANDY, A.K.; ROY, G. Triterpenoids, **Phytochemistry**, v.31, n.7, p. 2199-2249, 1992.

MAHATO, S.B.; SEN, S. Advances in triterpenoids research, **Phytochemistry**, v.44, n.7, p.1185-1236, 1997.

MAISONETTE, S.; MORATO, S.; BRANDÃO, M. L. Role of socialization and of 5-HT_{1A} receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. **Physiology and Behavior**, v. 54, p. 753-758, 1993.

MARTIJENA, A.; CALVO, N.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V. A. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. **Brain Research**, v. 752, p. 136-142, 1997.

MASSO, J.M.; CONDE, J.R; VILLAR, A.M.; MARTORELL, J. Effect of fepradinol on rat hind paw edema induced by several inflammatory agents. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.45, n.11, p.959-962, 1993.

MATHEUS, M. G; GUIMARÃES, F. S. Antagonism of non-NMDA receptors in the dorsal periaqueductal gray induces anxiolytic effect in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 132, p. 14-18, 1997.

MCNAIR, D.M., FRANKENTHALER, I.M., CZERLINSKY, T., WHITEN, T.W., SASSON, S. & FISHER, S. Simulated public speaking as a model of clinical anxiety. **Psychopharmacology**, v. 77, p. 7-10, 1982.

MCNICOL, A.; SHIBOU, T.S. Translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in activated platelets, **Thromb. Res.**, v.92, n.1, p.19-26, 1998.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, J. C. Advances in immunology. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MEFARLAND, P. J. The role of attention in the desinhibition of displacement activity. **Quarterly Journal of Experimental Psychology**, v. 18, p. 19-30, 1966.

MENDONÇA, F. I. I.; GUIMARÃES, F. S. Intra-hippocampal administration of cyclohexamide attenuates the restraint-induced exploratory deficit of na elevated plus-maze. **Behavioral Brain Research**, v. 91, p. 207-211, 1998.

MITCHELL, J.A.; LARKIN, S.; WILLIAMS, T.J. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation, **Biochem. Pharmacol.**, v.50, p.1535-1542, 1995.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 48, p. 254-260, 1955.

MORATO, S.; BRANDÃO, M. Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 1113-1120, 1997.

MORATO, S.; BRANDÃO, M. Transporting rats to the test situation on a cart com modify rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. **Psychobiology**, v. 24, p. 247-252, 1996.

MORATO, S.; CASTRECHINI, P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 707-710, 1989.

MOREIRA, A.; SAMPAIO, E.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K., KAPLA, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis fator alpha by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.**, v.177, p.1675-1680, 1993.

MOROI, M.; JUNG, S. M.; OKUMA, M.; SHINMYOZU, K. A patiente with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen – induced aggregation and adhesion. **J. Clin. Invest.**, v. 84, n. 5, p. 1440 - 1445, 1989.

MOSER, P. C. ; TRICKLEBANK, M.D.; MIDDLEMISS, D.N.; MIR, A. K.; HIBERT, M. F.; FOZARD, J. R. Characterization of MDL 73005ef as a 5-HT1A ligand and its effects in animal models of anxiety: comparison with buspirone, 8-OH-DPAT and diazepam. **Br. J. Pharmacol.**, v. 99, p. 343-349, 1990.

MOSER, P. C. Na evaluation of the elvated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. **Psychopharmacology**, v. 99, p. 48-53, 1989.

MOTTA, V.; MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; CASTRECHINI, P.; BRANDÃO, M. L. Effects of blockade of 5-HT2 receptors and activation of 5-HT1 receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berlin)**,v. 107, p. 135-139, 1992.

NETTO, S. M.; GUIMARÃES, F. S. role of hippocampal 5-HT1A receptors on elevated plus-maze exploration after a single restraint experience. **Behavioral Brain Research**, v. 77, p. 215-218, 1996.

NINAN, P.T., COLE, J.O. & YONKERS, K.A. Nonbenzodiazepine anxiolytics. In: A. F. Schatzberg & C.B. Nemeroff (orgs.) "**Psychopharmacology**". Washington: American Psychiatry Press, p. 287-300, 1998.

NURDEN, P; SAVI, P; HEILMANN, E; BIHOUR, C; HERBERT, J.M; MAFFRAND, J.P; NURDEN, A.T. An inherited bleeding disorder linked to a

defective interaction between ADP and its receptor on platelets. **J Clin Invest.**; v.95, p.1612–1622, 1995.

OHLMANN, P.; ECKLY, A.; FREUND, M.; CAZENAVE, J. P.; OFFERMANN, S.; GACHET, C. ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of G α q. **Blood**, v. 96, n. 6, p. 2134-2139, 2000.

OKWU, A. K.; MAIS, D. E.; HALUSHKA, P. V. Agonist-induced phosphorylation of human platelet TXA₂/PGH₂ receptors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1221, n. 1, p. 83 - 88, 1994.

PARRAT, J.R.; WEST, G.B. Inhibition by various substances of edema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine dextran, eggwhite and coumpound 48/80, **Br. J. Pharmacol.**, v.13, p.65-70, 1958.

PAYAN, D.G.; KATZUNG, B.G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; monopiod analgesics; drugs used in gout. In: KATZUNG, B.G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 6 ed. Connecticut: Apleton & Lange, 1046p., cap. 35, p.536-559, 1995.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.; BRILLEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 525-529, 1986.

PERNET, R. Phytochimie des Burseraceae, **Lloydia**, v.35, n.3, p.280-287, 1972.

PESOLD, C.; TREIT, D. Excitotoxic lesions of the septum produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and the shock-probe burying tests. **Physiology and Behavior**, v. 52, p. 37-47, 1992.

PESOLD, C.; TREIT, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Research**, v. 671, p. 213-221, 1995.

PESOLD, C.; TREIT, D. The neuroanatomical specificity of the anxiolytic effects of intraseptal infusions of midazolam. **Brain Research**, v. 710, p. 161-168, 1996.

PESOLD, C.; TREIT, D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Research**, v. 638, p. 295-301, 1994.

PIGNATELLI, P.; PULCINELLI, F. M.; LENTI, L.; GAZZANIGA, P. P.; VIOLI, F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. **Blood**, v. 15, n. 91, p. 484-490, 1998.

PLONE, M. A., EMERICH, D. F., LINDNER, M. D. Individual differences in the hotplate test and effects of habituation on sensitivity to morphine. **Pain**, v. 66, p. 265-270, 1996.

POUCET, B.; CHAPUIS, N.; DURUP, M.; THINUS-BLANC, C. A study of exploratory behaviour as an index of spatial knowledge in hamsters. **Animal Learning and Behaviour**, v. 14, n. 1, p. 93-111, 1986.

RADOMSKY, C.L.; LEVINE, N. Thalidomide. **Dermatol. Clin.**, v.19, p.87-103, 2001.

RAJIC, A.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R.M.; CHANDLER, R.M.; POLYA, G.M. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids, **Planta Medica**, v.66, n.3, p.206-210, 2000.

RAMESH, N., VISWANATHAN, M.B., SARASWATHY, A., BALAKRISHNA, K., BRINDHA, P., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Phytochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*, **Fitoterapia**, v.72, p. 934-936, 2001.

RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMEDE, P.; CHAULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioral Brain Research**, v. 85, p. 57-69, 1997.

RAMOS, A. e cols. Caracterização comportamental das linhagens brasileiras de ratos LEWIS e SHR: Um modelo genético para o estudo da ansiedade. www.ccb.ufsc.br/~andre/posters/POSTERFESBE.ppt. Acessado em 11/06/2004.

RENNER, M. J.; SELTZER, C. P. Molar characteristics of exploratory and investigatory behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 1051, p. 326-339, 1991.

REX, A.; SONDERN, L.; VOIGT, J. P.; FRANCK, S.; FINK, I. I. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 107-111, 1996.

RIBEIRO, J.E.L.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke**, 19ª edição, Inpa, p. 534-542, 1999.

RISTIMKI, A.; GARFINKEL, S.; WESSENDORF, J.; MACIAG, T.; HLA, T. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1^a, **Clin Exp. Immunol.**, v.73, p.449-455, 1994.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: Pharmacology, Methodology and Ethology. **Ethology and Psychopharmacology**. John Wiley & Sons, Nova York, v. 9, p. 43, 1994.

RODGERS, R. J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; HENDRIE, C. A. (Ed.). **Ethology and psychopharmacology**. Chichester: John Wiley and Sons, p. 9-44, 1994.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, p. 297-303, 1995.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J.; COLE, J. C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. I. Plus-maze retest profile in mice: Importance of initial stages of trial and response to post-trial cholinergic receptor blockade. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 41-50, 1996.

RONALD, M.B.; CHRISTOPHER, D.H. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. **Arch. Pharmacol.**, v.342, p.235-242, 1990.

ROSHAK, A. K.; CALLAHAN, J. F.; BLAKE, S. M. Small-molecule inhibitors of NF- κ B for the treatment of inflammatory joint disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 316-321, 2002.

ROSLAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice-effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p.235-242, 1990.

ROWLAND, T.L.; MCHUGH, S.M.; DEIGHTON, J.; EWAN, P.W.; DEARMAN, R.J.; KIMBER, I. Differential effect of thalidomide and dexamethasone on the transcription factor NF- κ B. **International Immunopharmacology**, v.1, p. 49-61, 2001.

RUEFF, A.; DRAY, A. Pharmacological characterization of the effects of 5-hydroxytryptamine and different prostaglandins on peripheral sensory neurons *in vitro*. **Agents Actions**, v.38, p. C13-C15, 1993.

RUGGERI, Z.M. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation, **Semin. Hematol.**, v.31, n.3, p. 229-239, 1994.

RUSSO, A.S.; GUIMARÃES, F. S, DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray in anxiety. **Psychopharmacology**, v. 110, 198-202, 1993.

SANTUEEI, L. B.; DAUDD, M. M.; ALMEIDA, S. S.; DE OLIVEIRA, L. M. Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 393-398, 1994.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat, **Br. J. Pharmacol.**, v.114, p.323, 1995.

SAWICKI, G.; SALAS, E.; MURAT, J.; MISZTA-LANE, H.; RADOMSKI, M.W. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation, **Nature**, v.386, p.616-619, 1997.

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

SCHIFFMAN, H.R.; LORE, R.; PASSIFIUME, J.; NEEB, R. Role of vibrissae for depth perception in the rat (*rattus norvegicus*). **Animal Behavior**, v. 18, p. 290-292, 1970.

SCHMITT, L.; HIEMKE, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 809-811, 1998.

SCHROR, K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 23, n. 4, p. 349 – 356, 1997.

SCORZA, M. C.; REYES-PARADA, M.; SILVEIRA, R.; VIOLA, I. I.; MEDINA, I.I.I; VIANA, M. B.; ZANGROSSI, I. I.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of putative anxiolytic 1-(2,5-dimethoxy-4-ethylthiophenyl)-2-aminopropane (ALEPII-2)

in rats and mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 355-361, 1996.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-350, 1989.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DE-LIMA JR. O.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, E.F.; OARES, R.O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A.C.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M.G.M.O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **J. Ethnopharmacology.**, v.66, p.57-69, 1999.

SIESS, W. Molecular mechanisms of platelet activation, **Physiol. Rev.**, v.69, n.1, p.58-178, 1989.

SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTETIN J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioral Brain Research**, v. 61, p. 59-64, 1994.

SONG, X. R.; TORPHY, T.J.; GRISWOLD, D. E.; SHEALY, D. Coming of age: Anti-cytokine therapies. **Molecular Interventions**, v. 2, p. 32-46, 2002.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF J.; GISPEN, W. H.; Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological Reviews**, v. 72, p. 825-852, 1992.

STEEN, K. H.; STEEN, A.E.; KREYSEL, H.W.; REEH, P.W. Inflammatory mediators potentiate pain induced by experimental tissue acidosis. **Pain**, v.66, p.163-170, 1996.

STEIN, L., WISE, C. D. & BERGER, B. D. Antianxiety actions of benzodiazepines: Decrease in activity of serotonin neurones in the punishment systems. In: S. Gratini, E. Mussini & L.O. Randell (eds) **Benzodiazepines**. New York: Raven Press, p. 299-326, 1973.

STOUT, J. C.; WEISS, J. M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and anxiolytic manipulations. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 47, p. 459-465, 1994.

SUBARNAS A.; TADANO, T.; OSHIMA, Y.; KISARA, K.; OHIZUMI, Y. Pharmacological properties of beta-amyrin palmitate, a novel centrally acting compound, isolated from *Lobelia inflata* leaves, **J. Pharm. Pharmacol.**, v.45, n.6, p.545-550, 1993.

SUBARNAS, A.; TADANO, T.; KISARA, K.; OHIZUMI, Y. An alpha-adrenoceptor-mediated mechanism of hypoactivity induced by beta-amyrin palmitate, **J. Pharm. Pharmacol.**, v.45, n.11, p.1006-1008, 1993.

SUBARNAS, A.; TADANO, T.; NAKAHATA, N.; ARAI, Y.; KINEMUCHI H.; OSHIMA, Y.; KISARA, K.; OHIZUMI, Y. A Possible mechanism of antidepressant activity of beta-amyrin palmitate isolated from *Lobelia inflata* leaves in the forced swimming test, **Life Sci.**, v.52, n.3, p.289-296, 1993.

SUBARNAS, A.; TADANO, T.; NAKAHATA, N.; ARAI, Y.; KINEMUCHI, H.; OSHIMA, Y.; KISARA, K.; OHIZUMI, Y. A possible mechanism of antidepressant activity of beta-amyrin palmitate isolated from *Lobelia inflata* leaves in the forced swimming test. **Life Sci**, v. 52, n. 3, p. 289-296, 1993.

SUBARNAS, A.; TADANO, T.; OSHIMA, Y.; KISARA, K.; OHIZUMI, Y. Pharmacological properties of beta-amyrin palmitate, a novel centrally acting compound, isolated from *Lobelia inflata* leaves. **Pharm. Pharmacol.**, v. 45, n. 6, p. 545-550, 1993.

SUSUNAGA, G.S. “Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae)”, 163f, (**Dissertação de Mestrado em Química Orgânica**), Universidade do Amazonas – UA, Manaus – AM, 1995.

TAKAHARA, K.; MURRAY, R.; FITZGERALD, G. A.; FITZGERALD, D. J. The response to thromboxane A₂ in human platelets: discrimination of two binding sites linked to distinct effector systems. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 6836 – 6844, 1999.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall, **Circ Res.**, v.88, p.877-887, 2001.

TENG, C. M.; LIN, C. H.; LIN, C. N.; CHUNG, M. I.; HUANG, T. F. Frangulin B, an antagonist of collagen – induced platelet aggregation and adhesion, isolated from *Ramulus formosana*. **Thromb. Haemostas.**, v. 70, p. 1014-1018, 1993.

THINUS-BLANC, C.; BOUZOUBA, L.; CHAIX, N.; CHAPUIS, M.; POU CET, B. A study of spatial parameters encoded during exploration in hamsters, **J. Exp. Psycho.**, v.13, n.4, p.418-427, 1987.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neuroscience and Bio-behavioral Reviews**, v. 9, p. 203-222, 1985.

TREIT, D. Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. **Handbook of Depression and Anxiety: A Biological approach**. Marsel Decker, Nova York, p. 201-224, 1994.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 31, p. 959-962, 1989.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAL, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 463-469, 1993a.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, p. 463-469, 1993.

VALLE, F. P. Effects of strain, Sex and illumination on open-field behavior in rats. **American Journal Psychology**, v. 83, p. 103-111, 1970.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs, **FASEB**, p.1-89, 1987.

VERMYLEN, J.; BADENHORST, P.N.; DECKMYN, H.; ARNOUT, J. Normal mechanisms of platelet function, **Clin Haematol.**, v.12, p.107-151, 1983.

VEZZA, R.; MEZZASOMA, A. M.; VENDITTI, G.; GRESELE, P. Prostaglandin endoperoxides and thromboxane A2 activate the same receptor isoforms in human platelets. **Thromb Haemost**, v. 87, n. 1, p. 114-121, 2002.

WADA, T. FUYUKA, N. Effects of DN-2327, a new anxiolytic, diazepam and buspirone exploratory activity of the rat in an elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 104, p. 404-450, 1991.

WEISS, H.J. Platelet Pathophysiology and Antiplatelet Drug Therapy, New York, **Alan R. Liss**, 1982.

WENDE, C.W.; MARGOLIN, S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed. Proc.**, v.15, p.494, 1956.

WILLIS, A.L. Parallel assay of prostaglandin-like activity in rat inflammatory exudates by means of cascade superfusion. **J. Pharm. Pharmac.**, v.21, p.126-128, 1969.

WINTER, C.A.; TISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenam-induced edema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs, **Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v.111, p.544-554, 1962.

WOLHEIM, F. A. Antiinflamatórios não hormonais: Utilização clínica e seus desafios na prática médica. **Rheumatology**, v. 39, p. 935-938, 2000. Disponível em <http://home.furb.br/jamoura/william%20Chahade.Comandatuba.ppt>. Acessado em 11/06/2004.

WOOLFE, G., MAC DONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 80, p. 300-307, 1944.

XIE, W.; ROBERTSON, D.L.; SIMMONS, D.L. Mitogen-induced prostaglandin G/H synthase: a new target for non-steroidal anti-inflammatory drugs, **Drug Dev. Res.**, v.25, p.249-265, 1992.

YARDUMIAN, D. A.; MACKIE, I. J.; MACHIN, S. J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, p. 701-712, 1986.

YING, Q.L.; RINEHART, A.R.; SIMON, S.R.; CHERONIS, J.C. Inhibition of human leukocyte elastase by ursolic acid – evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. **Biochem. J.**, v.277, p. 521-526, 1991.

YOKOYAMA, C.; TANABE, T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of enzyme, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.1665, p.888-894, 1989.

YU, Y.; CHADEE, K. Prostaglandin E₂ Stimulates IL-8 Gene Expression in Human Colonic Epithelial Cells by a Posttranscriptional Mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 161, p. 3746-3752. 1998.

ZANGROSSI JR., H. Modelos Animais de Ansiedade. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Ansiedade e transtornos de ansiedade**. Rio de Janeiro: Científica Nacional, p. 85-120, 1997.