



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

**PATRÍCIA BASTOS LUZ**

**FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA DO LÁTEX DE *Calotropis Procera* (AIT.) R. Br  
REDUZ HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA MECÂNICA EM CAMUNDONGOS:  
MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS**

**FORTALEZA**

**2012**

**PATRÍCIA BASTOS LUZ**

**FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA DO LÁTEX DE *Calotropis Procera* (AIT.) R. Br  
REDUZ HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA MECÂNICA EM CAMUNDONGOS:  
MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para Obtenção do título de Mestre em Farmacologia.**

**Orientadora (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.**

**Co-orientador (a): Dra. Karoline Sabóia Aragão**

**Fortaleza**

**2012**

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

---

L994f

Luz, Patrícia Bastos.

Fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (ait.) r. br reduz hipernocicepção inflamatória mecânica em camundongos: mecanismos e mediadores envolvidos/ Patrícia Bastos Luz. – 2012.

85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Coorientação: Dra. Karoline Sabóia Aragão

1. Calotropis. 2. Látex. 3. Hipernocicepção. 4. Neutrófilos. I.Título.

CDD 615.32

---

**PATRÍCIA BASTOS LUZ**

**FRAÇÃO PROTEICA ISOLADA DO LÁTEX DE *Calotropis Procera* (AIT.) R. Br  
REDUZ HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA MECÂNICA EM CAMUNDONGOS:  
MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Dra. Karoline Sabóia Aragão (Co-Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo  
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

À minha família, meu bem maior. Por dar  
sentido a minha existência.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me proporcionado paz de espírito, saúde e por sempre me guiar no caminho do bem. Sem Ele este momento não seria possível.

À minha mãe, Margarida, meu maior porto seguro. Pela amizade e infinita confiança em todas as minhas escolhas da vida. À minha irmã, Bia, por ser tão doce e generosa nos momentos difíceis. Sem as minhas fiéis companheiras a caminhada seria quase impossível. Ao meu pai, Zacarias, por sempre ter priorizado meus estudos e me alertar dos contratemplos da vida. Ao meu irmão, Paulo Victor pela amizade e apoio. À minha “cunhada-irmã”, Camila, por ser tão prestativa e bondosa. Amo vocês.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nylane Maria Nunes de Alencar, meu especial agradecimento, pelo constante apoio, confiança, compreensão e valiosos ensinamentos não limitados apenas à pesquisa, mas conselhos e experiências que levo para vida toda. Agradeço também pela enorme oportunidade de crescimento profissional e pela maravilhosa convivência durante os últimos cinco anos.

À minha co-orientadora, Karoline Sabóia Aragão, pelo constante incentivo, amizade e pela importante contribuição à minha vida acadêmica.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Márcio Viana Ramos e ao seu grupo de pesquisa, pelo fornecimento da fração proteica do látex colaborando com este trabalho;

Agradeço aos Professores Doutores Ronaldo de Albuquerque Ribeiro e Celina Monteiro da Cruz Lotufo, por terem aceitado o convite de integrar a banca examinadora desta Dissertação de Mestrado, contribuindo substancialmente para melhoria deste trabalho.

Às minhas grandes companheiras de Lab., Rachel Sindeaux e Lyara Barbosa, por terem participado do desenvolvimento deste trabalho desde o início, por dividirem momentos felizes e de angústias. Obrigada pela ótima convivência e amizade.

Ao Flávio e à Ingrid Samantha por estarem ao meu lado sempre que precisei e pelos valiosos conselhos durante a pós.

Agradeço a todos os integrantes do Lab. Bioquímica-Farmacologia: Ítalo, Tiago, Luana, Tamires, Tatiana, Alana, Daniele e Patrícia Sâmara pela maravilhosa convivência e por sempre estarem dispostos a ajudar. Este trabalho também é de vocês.

Às minhas grandes amigas, Camila, Laíse, Lílian, Nathália e Samara por participarem de quase todos os momentos importantes da minha vida. Obrigada pela amizade verdadeira e pelas confortantes conversas. Vocês me fazem um bem “danado”.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial Haroldo, Aura e Márcia, por sempre estarem dispostos a nos atender.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigada!

## RESUMO

*Calotropis procera* é uma planta laticífera encontrada na Ásia, África e América do Sul. Este vegetal tem sido bastante utilizado na medicina tradicional para diversas patologias. Seu látex é rico em proteínas que apresentam relevantes atividades farmacológicas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das proteínas do látex de *Calotropis procera* (LP) em modelos de dor aguda induzida por carragenina (Cg), por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), epinefrina e dor persistente induzida por adjuvante completo de Freud (CFA) pelo método Von Frey eletrônico. Foram utilizados camundongos Swiss (n=5-8, 25-30g). Na hipernocicepção mecânica (HM), os animais foram pré-tratados com LP (0,5; 5 e 50 mg/Kg e.v.), 30 min antes da aplicação de Cg (300µg/pata) e avaliados 1, 3 e 5h após Cg. Após 3 h da injeção de Cg, tecido subplantar foi coletado para quantificação do envolvimento de neutrófilos (MPO), citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1β), PGE<sub>2</sub> e KC. Na HM induzida por PGE<sub>2</sub> (100ng/pata), os animais receberam LP (5 e 50 mg/Kg e.v.) e avaliados 3h após PGE<sub>2</sub>. Para avaliar a participação de NO e canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> os animais foram pré-tratados com L-NAME (30 mg/kg i.p.) ou Glibenclamida (5 mg/kg i.p.). Na HM induzida por epinefrina (100ng/pata) os animais receberam LP (5 mg/Kg e.v.) e avaliados 2h após a injeção de epinefrina. Em modelo de dor persistente induzida por CFA foram avaliados HM e edema de pata durante 7 dias. Animais foram tratados com salina (controle, e.v.); LP (5mg/kg, e.v.), dexametasona (2mg/kg, s.c.) diariamente e, enquanto que o CFA (20 µL/pata, i.pl) foi injetado apenas no primeiro dia. No 8º dia a atividade motora dos animais foi avaliada através do teste rota rod (4RPM/min) e após este procedimento o tecido subplantar foi coletado para quantificação de MPO. LP (5 mg/kg) reduziu (p<0,05) a HM em 25%, 55% e 46% e LP 50 mg/kg em 39%, 64% e 60% na 1ª, 3ª e 5ª hora, respectivamente, quando comparadas ao grupo Cg. As doses 5 e 50mg/kg de LP diminuíram a concentração de MPO em 80% e 94%, respectivamente, quando comparadas ao grupo Cg. A dose 5mg/kg de LP reduziu a concentração de TNF-α, IL-1β, PGE<sub>2</sub> e KC em 71%, 81%, 72% e 72% respectivamente, quando comparada ao grupo Cg. Em modelo de HM induzida por PGE<sub>2</sub>, as doses de 5 e 50mg/kg de LP reduziram (p<0,05) a HM em 40% e 42%, respectivamente, quando comparadas ao grupo PGE<sub>2</sub>. Este efeito antinociceptivo do LP foi revertido com L-NAME (inibidor inespecífico da NO sintase) e glibenclamida (bloqueador dos canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>). A HM induzida por epinefrina foi reduzida pela LP. Na dor persistente, LP também reduziu HM e edema de pata em 42% e 59%, respectivamente, quando comparado ao grupo CFA. Nenhum grupo apresentou comprometimento do sistema motor. LP reduziu (p<0,05) MPO em 45% comparado ao grupo CFA. A partir destes dados podemos sugerir que o efeito antinociceptivo do LP estar intimamente relacionado com a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1β), PGE<sub>2</sub>, KC e da migração de neutrófilos, além do envolvimento de NO, canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> sensíveis a glibenclamida.

Palavras-chave: *Calotropis procera*. Proteínas laticíferas. Hipernocicepção mecânica. Neutrófilos.



## ABSTRACT

*Calotropis procera* is a laticiferous plant found in Asia, Africa and South America. This plant has been widely used in the traditional medicinal for the treatment of various diseases. Its latex is rich in proteins which have important pharmacological activities. This study aimed to evaluate the activity of protein from latex *Calotropis procera* (LP) in the models of acute pain induced by carrageenan (Cg), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), epinephrine and persistent pain induced by complete Freund's adjuvant (CFA) by Von Frey electronic method. Swiss mice were used (n=5-8, 25-30g). In mechanical hypernociception (MH), the animals were pretreated with LP (0.5, 5 and 50 mg/kg, iv) 30 min before Cg application (300µg/paw) and assessed 1, 3 and 5h after Cg. After 3 h of Cg injection, subplantar tissue was collected to quantify the involvement of neutrophils (MPO) pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-1β), PGE<sub>2</sub> and KC. In the MH-induced by PGE<sub>2</sub> (100ng/paw), the animals received LP (5 and 50 mg/kg, iv) assessed 3 hours after PGE<sub>2</sub>. To evaluate the role of NO and K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels, the animals were pretreated with L-NAME (30 mg/kg i.p.) or glibenclamide (5mg/kg i.p.). In the MH induced by epinephrine (100ng/paw) the animals received LP (5mg/kg i.v.) and after 2h of epinephrine injection MH were assessed. In the model of persistent pain induced by CFA were evaluated MH and paw edema for 7 days. Animals were treated with saline (control, i.v.); LP (5mg/kg, iv), dexamethasone (2mg/kg, s.c.) daily, while CFA (20µL/paw, i.pl.) was injected only on the first day. On the 8<sup>th</sup> day, motor activities of animals was assessed by the rota rod test (4 RPM/min) and after this procedure subplantar tissues were collected for quantification of MPO. LP (5 mg/kg) reduced (p<0.05) MH 25%, 55% and 46% and LP 50 mg/kg in 39%, 64% and 60% in the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> hours, respectively when compared to Cg group. Doses of 5 and 50 mg/kg of LP decreased MPO concentration in 80% and 94% respectively, compared to Cg group. LP dose of 5mg/kg reduced the concentration of TNF-α, IL-1β, PGE<sub>2</sub> and KC at 71%, 81%, 72% and 72% respectively, when compared to Cg group. In model MH PGE<sub>2</sub>-induced, the doses of 5 and 50mg/kg of LP reduced (p <0.05) MH 40% and 42% respectively, when compared to PGE<sub>2</sub> group. This antinociceptive effect from LP was reversed by L-NAME (non-specific inhibitors of NO synthase) and glibenclamide (K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channel blocker). The MH induced by epinephrine was reduced by LP. On the persistent pain, LP also reduced MH and paw edema by 42% and 59%, respectively, compared to the CFA group. Neither group showed impaired motor system. LP reduced (p <0.05) MPO by 45% compared to the group CFA. From these data we could suggest that the antinociceptive effect of the LP is closely related to the reduction of pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-1β), PGE<sub>2</sub>, KC, migration of neutrophils, in addition to the involvement of NO, glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels.

Keywords: *Calotropis procera*. Laticiferous proteins. Mechanical hypernociception. Neutrophils.

## LISTA DE SIGLAS

% = Percentagem

< = menor que

$\Delta$  = Delta

$^{\circ}\text{C}$  = Graus Centígrados

$\mu\text{L}$  = Microlitro

AINES = Antiinflamatórias não-esteroidais

Cm = Centímetro

C5a = Quinto componente do sistema complemento ativado

Cg = Carragenina

Da = Daltons

Dexa = Dexametasona (glicocorticóide)

E.P.M = Erro Padrão da Média

EDRF = Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês: Endothelium Derivated Relaxation Factor)

eNOS = Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (Endothelial form of nitric oxide synthase)

fMLP = Peptídeo N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina

g = Grama

IASP = Associação internacional para o estudo da dor

i.p. = Intraperitoneal

e.v. = Endovenosa

ICAM-1e ICAM-2 = Moléculas de adesão intercelular-1 e 2 (do inglês: Intercellular Adhesion Molecule)

IFN- $\alpha$  ou  $\gamma$  = Interferon alfa ou gama

IL-1 = Interleucina-1

IL-10 = Interleucina-10

IL-4 = Interleucina-4

IL-6 = Interleucina-6

IL-8 = Interleucina-8

iNOS = Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (inducible form of nitric oxide synthase)

L-NAME = N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginina-metilester

LP = Proteínas do látex de *Calotropis procera*

LTB<sub>4</sub> = Leucotrieno B<sub>4</sub>

mg = Miligrama

mL = Mililitro

nNOS = Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase

NO = Óxido nítrico (do inglês: Nitric oxide)

NOS = Enzima óxido nítrico sintase (do inglês: Nitric oxide sintase)

PAF = Fator de ativação de plaquetas (do inglês: platelet activator factor)

PGE = Prostaglandina da série E

PGI = Prostaglandina da série I (prostaciclina)

RIPs = Proteína inativadora de ribossomos (do inglês: ribosome inactivator proteins)

RPM = Rotação por minuto

s.c. = Subcutânea

SNC = Sistema nervoso central

TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: tumoral necrosis factor-alpha)

VCAM-1 = Molécula de adesão vascular (do inglês: vascular adhesion molecule)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Aspectos gerais da espécie *Calotropis procera*.....17
- Figura 2: Diagrama mostra a sequência de liberação de mediadores inflamatórios iniciados pela carragenina, intermediada por citocinas e indução final de prostanóides (PGs) e aminas simpáticas (AS) em camundongos.....29
- Figura 3: Protocolo experimental para avaliação do efeito da fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (LP) em modelo de hipernocicepção persistente induzida por adjuvante completo de Freud (CFA).....42
- Figura 4: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg).....44
- Figura 5: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz migração de neutrófilos induzida por carragenina (Cg) na pata de camundongos.....45
- Figura 6: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz a concentração de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e PGE<sub>2</sub>) no tecido subplantar de patas estimuladas com carragenina (Cg).....46
- Figura 7: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).....47
- Figura 8: Efeito anti-hipernociceptivo da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) em hipernocicepção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> depende da produção de NO: L-NAME reverte sua atividade.....48

Figura 9: Efeito anti-hipernociceptivo da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP) em hipernocicepção mecânica induzida por PGE <sub>2</sub> depende dos canais de K <sub>ATP</sub> : glibenclamida reverte sua atividade.....	50
Figura 10: Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP) reduz hipernocicepção mecânica induzida por epinefrina.....	51
Figura 11: Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP) reduz a hipernocicepção mecânica e edema de pata induzidos por adjuvante completo de Freud (CFA) em camundongos.....	53
Figura 12: Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP) reduz migração de neutrófilos induzida por adjuvante completo de Freud (CFA) na pata de camundongos.....	54
Figura 13: Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP) não interfere no desempenho motor de camundongos.....	55

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Látex vegetal.....</b>	<b>14</b>
1.1.1	Calotropis procera (Ait) R.Br.....	16
1.1.2	Potencial farmacológico da planta <i>Calotropis procera</i> .....	17
1.1.3	Potencial farmacológico do látex de <i>Calotropis procera</i> ...	18
<b>1.2</b>	<b>Dor.....</b>	<b>21</b>
1.2.1	Vias de transmissão da dor.....	22
1.2.2	Classificação da dor.....	23
1.2.3	Dor inflamatória.....	24
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolamento da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (Ait) R. Br.:</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>Animais experimentais.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Drogas e reagentes.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4</b>	<b>Equipamentos e materiais.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Método de Avaliação da Hipernocicepção: Pressão crescente na pata (Von Frey eletrônico).....</b>	<b>36</b>
<b>5.2</b>	<b>Modelos Experimentais de Hipernocicepção Mecânica.....</b>	<b>36</b>
5.2.1	Avaliação do efeito de LP na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina (Cg).....	36
5.2.2	Avaliação do efeito de LP na hipernocicepção induzida por prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ).....	39
5.2.3	Avaliação do efeito de LP na hipernocicepção induzida por epinefrina.....	40
5.2.4	Investigação do efeito de LP no modelo de hipernocicepção persistente induzida por adjuvante completo de Freud (CFA).....	40

5.3	Análises Estatísticas.....	42
6	RESULTADOS.....	43
6.1	Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP) reduz hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg).....	43
6.2	Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP) reduz hipernocicepção inflamatória induzida por prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ).....	47
6.3	Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP) reduz hipernocicepção mecânica induzida por epinefrina.....	50
6.4	Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP) reduz hipernocicepção persistente induzida por adjuvante completo de Freud (CFA).....	51
7	DISCUSSÃO.....	56
8	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Látex vegetal

O látex é uma secreção vegetal que se apresenta geralmente como um líquido de aspecto leitoso, mas dependendo da planta pode ter coloração avermelhada, amarelada, escura, transparente e ser mais viscoso ou não (ENDRESS; BRUYNS 2000; PICKARD, 2008). Este exsudato não apresenta nenhuma função metabólica conhecida para o vegetal, mas tem como principal atividade proteger a planta contra herbívoros, microorganismos ou dano mecânico selando o tecido danificado (AGRAWAL; KONNO, 2009).

Cerca de 12.500 espécies de 22 famílias de plantas ao serem submetidas às agressões mecânicas secretam látex, e por esta razão, são consideradas plantas laticíferas. As plantas laticíferas apresentam-se em diferentes formas morfológicas como arbustos, grandes árvores ou ervas e se desenvolvem em diversos habitats (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008).

Entre as famílias de plantas produtoras de látex, destacam-se a Euphorbiaceae (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987a) e Apocynaceae (BROCKBANK; LYNN, 1979), embora outras famílias como Moraceae, Compositae, Anarcadiaceae e Sapotaceae também produzam o látex (DELTA, 1982).

Plantas comuns conhecidas como Hortência (*Calotropis procera*), Jasmim (*Plumeria rubra*), Unha-de-onça (*Cryptostegia grandiflora*), Aveloz (*Euphorbia tirucalli*), Sapoti (*Achras sapota*), Mamão (*Carica papaya*) Dormideira (*Papaver somniferum*) são plantas produtoras de látex. Entretanto, a planta laticífera mais conhecida e estudada devido seu impacto econômico é a Seringueira (*Hevea brasiliensis*), uma árvore nativa da Amazônia, também conhecida como “árvore da borracha”. A partir do látex desta planta são produzidos inúmeros produtos derivados da borracha de grande importância comercial (SUSSMAN et al., 2002).

O látex se apresenta como uma dispersão coloidal, na qual a borracha representa a fase dispersa sendo constituída por 96% de hidrocarbonetos, 1% de proteína, 3% de lipídios e traços de magnésio, potássio e cobre. A fase aquosa contém diferentes classes de compostos suspensos ou em solução, incluindo proteínas, carboidratos, bases nitrogenadas e restos celulares (ARCHER et al.,



1969; MORCELLE; CAFFINI; PRIOLO, 2004; SEMEGEN, 1978). No fluido também já foram encontrados diferentes metabólitos secundários como: alcaloides, terpenos, cardenolídeos, compostos fenólicos, flavonoides, taninos variando suas concentrações de acordo com as espécies estudadas (MORCELLE; CAFFINI; PRIOLO, 2004; AGRAWAL; KONNO, 2009).

O látex proveniente de vegetais é uma importante fonte de proteases e mais de 110 famílias de diferentes plantas laticíferas se caracterizam por apresentar, pelo menos, uma enzima proteolítica em sua composição química (DOMSALLA; MELZIG, 2008). Diferentes proteínas e enzimas têm sido identificadas no látex de plantas: proteases, como cisteína e serina (RAMOS et al., 2010; RASMANN; JOHNSON; AGRAWAL, 2009; PATEL; SINGH; JAGANNADHAM, 2007; TOMAR; KUMAR; JAGANNADHAM, 2008); oxidases, como peroxidase e lipoxigenase (SETHI et al., 2009; WALZ et al., 2004); lectinas e quininas (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1986a; RAMOS et al., 2010; KITAJIMA et al., 2010); lipases (FIORILLO et al., 2007); fosfatase (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1986b); lisozimas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) (GIORDANI; LAFON, 1993), dentre outras.

As proteases representam maior porcentagem das proteínas presentes no látex e parecem desempenhar papel relevante para o desenvolvimento de respostas da planta frente aos patógenos externos resultando em uma defesa eficaz. Além disso, estas enzimas são capazes de ativar receptores específicos de proteases agindo desta forma como relevantes agentes farmacológicos ou toxicológicos (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008).

No látex de *H. brasiliensis*, a seringueira, foram identificados, através de eletroforese, mais de duzentos polipeptídeos, dos quais vários são enzimas (KEKWICK, 2001). Além disso, foi relatada a ocorrência de diversas proteínas como: beta-1,3-glucanases (CHEYE; CHEUNG, 1995), lisozimas, glicosidases (GIORDANI; LAFON, 1993), amilase (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987b), dentre outras. O látex de *Carica papaya* contém uma mistura de endopeptidases do tipo cisteína (DUBOIS, 1988), como a papaína (MITCHEL; CHAIKEN; SMITH, 1970), as quimopapaínas A e B, a diferentes endopeptidases (BARRET; BUTTLE, 1985; RITONJA et al., 1989; DUBOIS, 1988).

A grande diversidade de compostos identificada nos látex de diferentes plantas indica que o tecido especializado na produção deste exsudato deve estar envolvido em eventos biológicos distintos no vegetal que vão desde o acúmulo de

substâncias precursoras da borracha até compostos relacionados à defesa do vegetal contra pragas e patógenos como algumas proteinases que apresentam atividade bactericida e/ou antifúngica (KEKWICK, 2001; PEREIRA et al., 1999; SHUKLA; MURTI, 1961; LARHSINI et al., 1997).

### **1.1.1 *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.**

*Calotropis procera* (Ait.) R. Br. é uma espécie vegetal pertencente à família Apocynaceae. É popularmente conhecida por diferentes nomes dependendo do estado em que é encontrada: algodão de seda ou seda (PE), paninha de seda (SP), leiteiro (SP, MG), flor-de-seda, ciúme ou hortêncica (CE). Esta espécie é nativa da Índia e África Tropical, mas pode ser encontrada em quase todas as regiões tropicais da América, incluindo o Brasil. Apresenta-se como um arbusto perene ou subarbórea ereta com pouca ramificação e que pode alcançar até 3,5m de altura. Suas folhas são grandes, subcoriáceas; seus frutos são globosos, grandes, com sementes cobertas por painas brancas sedosas; suas flores são de cor roxa, dispostas em inflorescência fasciculadas terminais (Figura 1). A sua disseminação se dá apenas por sementes transportadas pelo vento (KISSMANN; GROTH, 1999; LORENZI; MATOS, 2002).

**Figura 1: Aspectos gerais da espécie *Calotropis procera*.**



(A) Arbusto bem desenvolvido na forma adulta ([www.uochb.cas.cz/~natur/cerambyx/calotropis.html](http://www.uochb.cas.cz/~natur/cerambyx/calotropis.html)); (B) Frutos globosos ([www.aiys.org/webdate/gtzrep.html](http://www.aiys.org/webdate/gtzrep.html)); (C) Sementes envolvidas com fios de seda ([toptropicals.com/HTML/toptropicals/catalog/photo\\_db/C.html](http://toptropicals.com/HTML/toptropicals/catalog/photo_db/C.html)); (D) Flores de cor roxa.  
 Fonte: [www.kingsnake.com/westindian/ecosystemsgeographyoringins1](http://www.kingsnake.com/westindian/ecosystemsgeographyoringins1).

### **1.1.2 Potencial Farmacológico da planta *Calotropis procera***

Diferentes partes da planta *C. procera*, como: caule, frutos, flores, raízes, folhas e o látex, são capazes de induzir um número variado de atividades farmacológicas. Na medicina tradicional indiana, essa planta tem sido utilizada para uma variedade de doenças incluindo lepra, úlceras, tumores, hemorroidas, reumatismo, doenças do baço, fígado e abdômen. No estado do Ceará a planta é

usada pela população de baixa renda para doenças de pele causadas por bactérias ou fungos.

Diferentes estudos com modelos experimentais *in vivo* e/ou *in vitro* têm sido realizados com diferentes partes de *C.procera* e importantes atividades foram demonstradas.

Com relação às flores, observou-se atividade citotóxica contra células cancerígenas humanas (SMIT et al., 1995); efeito anti-inflamatório em modelo inflamação induzida por carragenina; antipirético e diminuição das contorções abdominais induzidas por ácido acético (MASCOLO et al., 1988), além da atividade hepatoprotetora em hepatite causada por paracetamol (RAMACHANDRA et al., 2007) e efeito anti-helmíntico *in vivo* e *in vitro* (IQBAL et al., 2005).

Nas cascas do tronco de *C. procera*, foi demonstrado propriedades antitussígena (DIEYE et al., 1993), anti-inflamatória em edema de pata induzido por carragenina e ação protetora da mucosa gástrica em úlceras causadas por ácido acetilsalicílico e etanol (TOUR; TALELE, 2011) e ainda atividade antiproliferativa de células tumorais (MAGALHÃES et al., 2010).

As raízes desta planta apresentam atividade antitumoral (VAN QUAQUEBEKE et al., 2005; MATHUR et al., 2009), anti-inflamatória em modelo de artrite induzida por formaldeído e adjuvante completo de Freud (BASU; CHAUDHURI, 1991; PARIHAR et al., 2011), assim como atividade antiulcerosa (SEN; BASU; CHAUDURI, 1998).

### **1.1.3 Potencial Farmacológico do látex de *Calotropis procera***

*Calotropis procera* é uma planta laticífera e no seu látex já foram identificados inúmeros compostos tais como cardenilídeos, alcaloides, enzimas proteolíticas e carboidratos (SEIBER; NELSON; MARK LEE, 1982; SALUNKE et al., 2005), esteroides, triterpenos e carbonatos orgânicos (GALLEGOS-OLEA et al., 2002), proteinases do tipo cisteínicas, quitinases e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo vegetal (FREITAS et al., 2007; SINGH et al., 2010). Recentemente foram identificadas neste látex uma proteína inibidora de papaína (RAMOS et al., 2010) e osmotina (FREITAS et al., 2011).

De todas as partes da planta *C. procera*, o látex tem sido a mais estudada e mais citada na literatura por conter relevantes atividades farmacológicas.

O látex bruto (fração proteica mais borracha) é extraído diretamente da planta em solventes orgânicos ou aquosos e apresenta efeitos variados de acordo com o tipo de solvente usado para extração e/ou a via de administração utilizada.

O látex bruto em solvente aquoso apresenta efeito antioxidante e hipoglicemiante quando administrado por via oral em ratos tratados com aloxano (KUMAR; PADHY, 2011), além de ser hepatoprotetor em modelo experimental de hepatite induzida por tetracloreto de carbono, mostrando uma importante atividade anti-inflamatória (PADHY; SRIVASTAVA; KUMAR, 2007). Artigos publicados por Kumar e Shivkar (2004) e por Kumar e Sehgal (2007) demonstraram efeitos pró-inflamatórios (edema e hiperalgesia) quando o látex bruto foi administrado diretamente na pata de ratos, com envolvimento da prostaglandina, histamina e serotonina. Além destas atividades, o extrato aquoso também apresenta significativa ação cicatrizante quando aplicado sobre as superfícies das lesões nos dorsos de porquinhos-da-índia (RASIK et al., 1999) e também foi capaz de reduzir diarreia e temperatura corporal em ratos quando administrado por via oral (LARHSINI et al., 2002; KUMAR et al., 2001).

O látex bruto quando extraído em solventes orgânicos demonstra atividade antibacteriana (SHUKLA; MURTI, 1961; LARHSINI et al., 1997), molusquicida (HUSSEIN et al., 1994) e esquistossomicida (SHARMA; SHARMA, 2000) e antifúngica contra *Candida albicans* (SEHGAL; ARYA; KUMAR, 2005). O extrato metanólico administrado por via oral apresentou efeito anti-inflamatório e antioxidante em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freud (KUMAR; ROY, 2007).

É necessário destacar que as atividades farmacológicas citadas foram obtidas a partir de experimentos realizados com o látex íntegro dissolvido em solventes aquosos ou orgânicos e que não houve estudos mais apurados sobre a composição química, bioquímica ou possíveis moléculas presentes nestes extratos responsáveis pelos efeitos descritos acima. Estes trabalhos foram realizados de modo exploratório não contemplando um eficiente método de extração, separação ou isolamento de compostos. Desta forma, o nosso grupo de pesquisa iniciou uma linha de estudo no sentido de investigar propriedades farmacológicas e bioquímicas do látex de *C. procera*, mas não na sua forma íntegra e sim com frações proteicas, isentas de borracha e obtidas a partir do látex bruto por processos de diálises, centrifugações e cromatografias. Os protocolos utilizados permitiram o isolamento de uma fração

proteica (LP) não somente livre de borracha, mas também de metabólitos secundários e todos os outros de massa molecular inferior a 8.000 Da, separadas pela etapa de diálise (ALENCAR et al., 2006; RAMOS et al., 2009). Esta fração (LP) tem sido avaliada em diferentes modelos experimentais e importantes propriedades farmacológicas foram demonstradas.

O primeiro estudo realizado para investigar propriedades farmacológicas de LP foi por Alencar et al. (2004). Foi demonstrado que LP administrada por via intravenosa foi capaz de reduzir o processo inflamatório nos modelos experimentais de peritonite e edema de pata induzidos por carragenina e cistite hemorrágica por ciclofosfamida em camundongos. Importante atividade antinociceptiva da fração proteica foi demonstrada em modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, lambadura da pata induzida por formalina e placa quente (SOARES et al., 2005).

Em estudo feito com subfrações LPPI, LPPII e LPPIII, isoladas a partir de LP, demonstrou-se que as três sub-frações tiveram efeitos anti-inflamatórios na peritonite por carragenina, além de reduzirem o rolamento e adesão de leucócitos, sendo estes efeitos mais significativos em animais tratados com LPPI, possivelmente relacionado com o significativo aumento de óxido nítrico (NO) no sangue causado por esta subfração em animais com inflamação (RAMOS et al., 2009).

LP também apresentou diminuição da hiperalgesia em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freud (KUMAR et al., 2011). Em modelos de infecção bacteriana sistêmica induzida por *Samonela Typhimurium* em camundongos, LP demonstrou efeito benéfico aumentando o tempo de sobrevivência dos animais, efeito este, relacionado com a modulação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-12), óxido nítrico e uma atividade imunoestimulante (OLIVEIRA et al., 2012; LIMA-FILHO et al., 2010). Neste mesmo modelo de infecção bacteriana, estudo recente mostrou o efeito significativo da fração proteica (LP) e das suas subfrações (LPPI, LPPII e LPPIII) em manter a homeostase da coagulação sanguínea em animais sépticos. LP foi capaz de aumentar a contagem de plaquetas e o tempo de coagulação nos animais infectados, estando este último efeito demonstrado também pelas subfrações LPPII e LPPIII além de apresentarem atividades proteolíticas semelhantes à trombina e plasmina, importantes enzimas da coagulação sanguínea. A LPPI, subfração desprovida de atividade proteolítica, não mostrou efeito semelhante às demais (RAMOS et al., 2012).

Com relação às atividades na área oncológica, a fração proteica demonstrou atividade antiproliferativa sobre diferentes linhagens de células cancerígenas (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

Em trabalho recente também do nosso grupo, foi demonstrado que LP diminui a resposta inflamatória da mucosite oral induzida por 5-fluorascil em hamsters através de “downregulation” de citocinas pró-inflamatórias (FREITAS et al., 2012. Aceito para publicação)

## 1.2 Dor

Dor é definida pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) como uma “*experiência sensorial ou emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial*”. Esta definição agrega à percepção da sensação dolorosa aspectos psicológicos, sociais, emocionais e ambientais. Isso ocorre porque a dor além de ser uma percepção dos estímulos nocivos quando receptores sensoriais são ativados (NOBACK et al., 1996; LOESER; MELZACK, 1999), também envolve um componente emocional-afetivo incluindo atenção e aprendizagem (BONICA, 1990).

A partir daí faz-se necessário uma distinção entre dois termos, nocicepção e dor. A nocicepção refere-se somente à percepção do sinal no sistema nervoso central evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de um tecido danificado (FÜRST, 1999). Por outro lado, a dor envolve tanto o componente sensorial, quanto o emocional que se relaciona com condições motivacionais, psicológicas bem como experiências de vida de cada pessoa que normalmente se associam aos quadros dolorosos (COUTAUX et al., 2005). A partir destes conceitos pode-se afirmar que a dor seria o termo mais adequado para o homem enquanto que nocicepção ou sensação nociceptiva seria mais indicada para modelos experimentais com animais (NOBACK et al., 1996).

A hiperalgesia, outro termo importante, é uma alteração sensorial que se caracteriza por exacerbar a sensação dolorosa, ou seja, receptores respondem a estímulos nocivos de forma mais intensa produzindo mais dor, mediante a uma estimulação nociva. Isso ocorre devido à sensibilização dos nociceptores silenciosos, normalmente inativos, que são recrutados após algum dano tecidual e respondem a uma variedade de estímulos. (DRAY; BEVAN, 1993; JULIUS; BASBAUM, 2001; LOESER; MELZACK, 1999; GUYTON; HALL, 2002). Na clínica

este termo também é conhecido como “dor anormalmente intensa”. Diferentemente de hiperalgesia, o termo alodinia é definido, segundo a IASP, como a dor decorrente de um estímulo normalmente não doloroso.

Assim como outras modalidades sensoriais, a dor é necessária para a sobrevivência e manutenção da integridade do organismo. Entretanto quando esta se torna sustentada, acarreta sintomas secundários como ansiedade e a depressão, diminuindo acentuadamente a qualidade de vida do indivíduo (HUNT; MANTYH, 2001).

### **1.2.1 Vias de transmissão da dor**

Quando o estímulo nociceptivo, seja ele mecânico, químico ou térmico, ativa os nociceptores periféricos, o sinal é conduzido através dos neurônios primários até o corno dorsal da medula espinhal. Neste local, o neurônio primário realiza sinapse com o neurônio secundário que, cruzando a medula espinhal, envia a informação nociceptiva através de tratos nervosos específicos. Suas aferências realizam uma segunda sinapse com neurônios terciários no núcleo lateral e medial do tálamo. Por fim, estes neurônios enviam sinais ao córtex somatossensorial primário e secundário, envolvidos com localização, duração e intensidade do estímulo nociceptivo (FARQUHAR-SMITH, 2007; VANDERAH, 2007; MARCHAND, 2008).

Distribuídos de forma ubíqua no nosso organismo, os nociceptores são os responsáveis pela percepção do estímulo nocivo. Estes receptores são terminais periféricos de neurônios sensitivos primários cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) ou nos gânglios trigêmeos. São distribuídos em três classes principais de acordo com os diferentes estímulos: (1) nociceptores térmicos (ativados por temperaturas extremas); (2) nociceptores mecânicos (ativados por pressão intensa aplicada na pele) e (3) nociceptores polimodais (ativados por estímulos mecânicos, químicos ou térmicos de alta intensidade). A sensibilização destes nociceptores causa uma redução do seu limiar de ativação e, em alguns casos, atividade espontânea.

O estímulo mecânico é causado por um estiramento físico da terminação nervosa, ativando canais transmembranares. Estes canais, geralmente fechados, quando estimulados permitem o influxo de íons, resultando na despolarização da célula. Os nociceptores químicos são ativados por íons e citocinas específicas,



sendo estas substâncias pertencentes ao meio ou liberada por células danificadas. Elas incluem íons ( $H^+$  e  $K^+$ ), espécies reativas de oxigênio, histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas, substância P, dentre outras (MEYR; STEINBERG, 2008; BASBAUM et al., 2009).

As fibras nervosas são classificadas de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução em três grupos distintos: fibras  $A\beta$ , fibras  $A\delta$  e fibras C. As fibras  $A\beta$  estão principalmente relacionadas à condução de estímulos não-nociceptivos, como a vibração e movimento. São mais mielinizadas e com alta velocidade de condução, estando relacionada à modulação da nocicepção, ativando interneurônios inibitórios para a redução de estímulos nociceptivos. As fibras  $A\delta$  são relativamente mielinizadas e apresentam menor velocidade de condutância quando comparada à  $A\beta$ . São divididas em mecanonociceptores (sensíveis a estímulos mecânicos intensos e potencialmente danosos) e polimodais (sensíveis a estímulos mecânicos, térmicos e químicos), sendo responsáveis pela primeira sensação dolorosa. Por fim, as fibras C são de pequeno calibre e amielinizadas apresentando uma velocidade de condução bem inferior às demais fibras. Possuem caráter polimodal, sendo responsáveis pela sensação dolorosa tardia (FARQUHAR-SMITH, 2007; VANDERAH, 2007; MARCHAND, 2008).

Considerando a diferença de velocidade de transmissão do estímulo entre as fibras  $A\delta$  e C, a nocicepção se apresenta de uma forma característica. Primeiramente, as fibras  $A\delta$  transmitem rapidamente uma sensação nociceptiva breve e aguda, percebida exatamente no ponto de estímulo. Em seguida, as fibras C transmitem a sua informação com um pequeno retardo, resultando em uma sensação dolorosa mais profunda e difusa (MARCHAND, 2008).

### **1.2.2 Classificação da dor**

A classificação do processo doloroso é diversificada e depende do critério adotado. A dor pode ser caracterizada segundo critérios temporais e do ponto de vista fisiológico. De acordo com os critérios temporais é classificada em transitória, aguda ou crônica (FUCHS; WANNAMACHER; FERREIRA, 2006).

Na dor transitória ocorre ativação dos nociceptores independente da existência ou não de qualquer dano tecidual, sendo então este tipo de dor responsável pela proteção do organismo frente a possíveis danos físicos oriundos

de estresse tecidual ou mesmo ambiental (LOESER; MELZACK, 1999). Já a dor aguda ocorre a partir da estimulação excessiva dos nociceptores, originando sensação intensa e desagradável envolvendo uma lesão tecidual. Tanto na dor transitória como na dor aguda, a causa é bem definida e o curso temporal de ambas são limitados. Muitas vezes são descritas como uma reação saudável do organismo, permitindo identificar um desequilíbrio homeostático e a partir daí acionar uma reação de alerta frente ao estímulo danoso (MEYR; STEINBERG, 2008).

Em contrapartida, a dor crônica está associada a alterações da via fisiológica normal, originando hiperalgesia, alodinia ou dor espontânea sem qualquer estímulo precipitante, podendo se estender por meses ou anos. A cronificação da dor é resultante de um processo de sensibilização periférica e central que ocorre devido ao caráter dinâmico da dor e das vias envolvidas através de mecanismos excitatórios e inibitórios (MARCHAND, 2008; MEYR; SAFFRAN, 2008).

Em se tratando do ponto de vista fisiológico, a dor pode ser classificada em:

- a) nociceptiva: caracteriza-se por ser uma resposta fisiológica ao funcionamento normal tanto do sistema nervoso central (SNC) quanto do periférico (SNP), protegendo o organismo de um dano ou eminente (SALTER, 2005);
- b) inflamatória: está relacionada com processo inflamatório presente principalmente na dor crônica. Mediadores químicos liberados devido à injúria tissular ou da ativação do sistema imunológico são os responsáveis pela sensibilização dos nociceptores (FERREIRA, 1979; HANDWERKER, 1976; BASBAUM; JESSELL, 2000);
- c) neuropática: associada a um processamento somatossensorial anormal ao nível periférico ou central podendo ser iniciada após lesão nervosa, uso crônico de determinadas drogas ou associadas a algumas patologias (Câncer, AIDS, diabetes) (BARON, 2000);
- d) neurogênica: é aquela que ocorre com o dano diretamente sobre as inervações;
- e) psicogênica: é aquela que não possui causa orgânica, mas se expressa em conseqüências de problemas psicológicos (MENEZES, 1999).

### **1.2.3 Dor inflamatória**

A inflamação é conhecida desde a antiguidade e o primeiro a descrevê-la em seus constituintes fundamentais foi Aulo Cornélio Celso, na Roma antiga, cerca

de 50 a.C.. Foi a partir de seus estudos que surgiram os sinais cardeais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. O processo inflamatório se caracteriza por ser uma resposta imune complexa e sincronizada desenvolvida por tecido vascularizado vivo frente a um dano tecidual/celular causado por estímulos físicos, químicos, imunológicos ou microbianos (HUME; FAIRLIE, 2005). A reação inflamatória se caracteriza por ser um processo homeostático, cujo objetivo é reparar a lesão, isolar ou destruir o agente agressor e ativar os mecanismos de reparo necessários para garantir o reestabelecimento das funções normais do organismo (LEVY, 1996).

É frequente um processo inflamatório estar relacionado aos mecanismos que envolvem a nocicepção. A dor associada à inflamação é resultante de mudanças funcionais em neurônios aferentes (nociceptores). A sensibilização destes receptores é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativá-lo, além do aumento da atividade espontânea da célula nervosa e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiáres (WALL; MELZACK, 1999). Alterações no microambiente da área lesada ocorrem devido à liberação de vários mediadores inflamatórios que promovem de forma sinérgica uma alteração no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores levando ao aparecimento da dor inflamatória (BONICA et al., 1990; MEYER; CAMPBELL; RAJA, 1994).

Dois grupos de mediadores inflamatórios são igualmente importantes na transmissão nociceptiva: aqueles que ativam diretamente os nociceptores e os que apenas sensibilizam estes receptores. As prostaglandinas, as aminas simpáticas (noradrenalina, adrenalina, dopamina), substância P, endotelinas e bradicinina representam o primeiro grupo; e óxido nítrico, fator de crescimento neural (NGF) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) representam o segundo grupo de mediadores (TURNBACH; RANDICH, 2002; DOURSOUT; LIANG; CHELLY, 2003; CUNHA et al., 1991).

Os principais eicosanóides envolvidos tanto na geração da inflamação como também da dor, são os leucotrienos (LTs) e as prostaglandinas (PGs). Estes mediadores promovem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e edema nos sítios de inflamação, enquanto que na nocicepção inflamatória a participação das PGs, principalmente a PGE do tipo 2 (PGE<sub>2</sub>) foi demonstrada utilizando-se pelo menos três métodos nociceptivos, o teste de pressão constante na pata de ratos

(NAKAMURA; FERREIRA, 1987), o teste de contorções abdominais em camundongos (DUARTE; NAKAMURA; FERREIRA, 1988) e o teste de estimulação elétrica em cobaias (NAKAMURA; LICO, 1986).

Os eicosanóides são produtos do processamento do ácido araquidônico (AA) que normalmente é encontrado esterificado a fosfolipídios de membrana, de onde é liberado por ação de fosfolipases, como a fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>). O AA sofre ação da enzima ciclooxigenase (COX) originando intermediários que são convertidos a prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos, juntos conhecidos como prostanóides. A COX se apresenta no organismo como duas isoformas distintas: COX-1 e COX-2 (FU et al., 1990; XIE et al., 1991). A COX-1 é uma enzima constitutiva que se expressa praticamente em todos os tecidos, onde medeia relevantes funções homeostáticas (VANE; BOTTING, 1998). Já a COX-2 é expressa por células que estão envolvidas em processos inflamatórios e tem sido descrita como a isoforma responsável pela síntese de prostanóides envolvidos em processos patológicos como estados inflamatórios agudos e crônicos e também na dor (HINZ; BRUNE, 2002; FLOWER, 2003). Os AINES são medicamentos que inibem as ciclooxigenases e são largamente utilizados na dor e inflamação. Existem classes destes medicamentos que antagonizam seletivamente a COX-2, apresentando desta forma, melhor efeito sobre processos envolvendo dor e inflamação.

Outra via importante de metabolização do AA é a da lipoxigenase (LOX), originando os leucotrienos (LTs): ácido hidroeicosatetraenóico (HETEs) e as lipoxinas (MACMAHON et al., 2001). Dentre os leucotrienos mais importantes está o LTB<sub>4</sub>, que causa aderência de neutrófilos ao endotélio e apresenta uma potente atividade quimiotática para neutrófilos. A administração de LTB<sub>4</sub> induz nocicepção tanto em animais (LEVINE et al., 1984) quanto em humanos (BISGAARD; KRISTENSEN, 1985). Cunha e Ferreira (2003) demonstraram papel crucial do LTB<sub>4</sub> na hipernocicepção inflamatória de origem imune.

As endotelinas (ETs) são mediadores peptídicos que estão relacionados ao desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, incluindo aqueles que envolvem hipertensão, inflamação e dor, dentre outros (FILEP; FOURNIER; FOLDES-FILEP, 1995; SCHIFFRIN, 2005). A produção/secreção de ETs pode ser estimulada, por LPS, Cg, citocinas e fatores de crescimento (KLEMM et al., 1995; RAE; HENRIQUES, 1998). A administração destes peptídeos induz contorções abdominais em roedores, hiperalgesia mecânica em ratos e incapacitação articular

em cães e ratos (RAFFA; JACOBY, 1991; FERREIRA; ROMITELLI; De NUCCI, 1989; DE-MELO et al., 1998). A hipernocicepção induzida pelas endotelinas parece não depender nem de prostaglandinas nem de aminas simpáticas, uma vez que seus efeitos hipernociceptivos não foram bloqueados pela indometacina (AINE não-seletivo) ou atenolol (antagonista dos receptores  $\beta$ 1 adrenérgicos) (VERRI et al., 2004).

A bradicinina (BK) é um importante mediador envolvido em vários aspectos da inflamação incluindo a dor (COUTERE et al., 2001; STERANKA et al., 1988). Além de ativar diretamente os nociceptores ela também induz a sensibilização indireta destes receptores através da ativação da produção de prostaglandinas, aminas simpáticas e citocinas (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993a; KHASAR et al., 1998; CUNHA et al., 2007). Este peptídeo de alto peso molecular exerce seus efeitos biológicos através da ativação dos receptores B1 e B2. O receptor B2 é constitutivo estando presente em tecidos centrais e periféricos e são responsáveis pelos efeitos fisiológicos da BK. Já o receptor B1 é geralmente ausente em tecidos normais, mas pode ser induzido e super expresso durante uma lesão tecidual ou pela administração de alguns mediadores inflamatórios (PRADO et al., 2002; MOREAU et al., 2005).

Citocinas são peptídeos simples de baixos pesos moleculares produzidos e liberados por todo tipo celular em resposta a uma variedade de estímulos, como vírus, parasitas, bactérias e seus produtos bem como em resposta a outras citocinas. Atuam em receptores específicos do tipo tirosina-quinase presentes nas próprias células que as produziram (efeito autócrino) ou em receptores de outras células que não as que produziram (efeito parácrino) e ainda podem atingir a circulação sanguínea e agir em tecidos distantes (efeito hormonal). A maioria das citocinas apresenta múltiplas funções biológicas, como diferenciação, sobrevivência, crescimento e metabolismo celular bem como participam de processos inflamatórios e imunológicos (AGGARWAL; PURI, 1995; VILCEK, 2003).

No processo inflamatório as citocinas estão envolvidas na ligação entre local da injúria ou reconhecimento do não próprio ao sistema imunológico que após sua ativação ocorre o desenvolvimento de respostas inflamatórias locais e sistêmicas como migração celular, edema, febre, liberação de proteínas de fase aguda e hipernocicepção (BLACKWELL; CHRISTMAN, 1996; DINARELLO, 2000; HOPKINS, 2003; CUNHA; FERREIRA, 2005; CONTI et al., 2004).

Estímulos inflamatórios como Cg (carragenina) e LPS (lipopolisacarídeo de *E. coli*) induzem a hipernocicepção de forma indireta através da liberação de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias e posterior aumento da migração de neutrófilos que promovem, após diapedese, a liberação de outros mediadores hiperalgésicos amplificando ainda mais o processo doloroso (LEVINE et al., 1994).

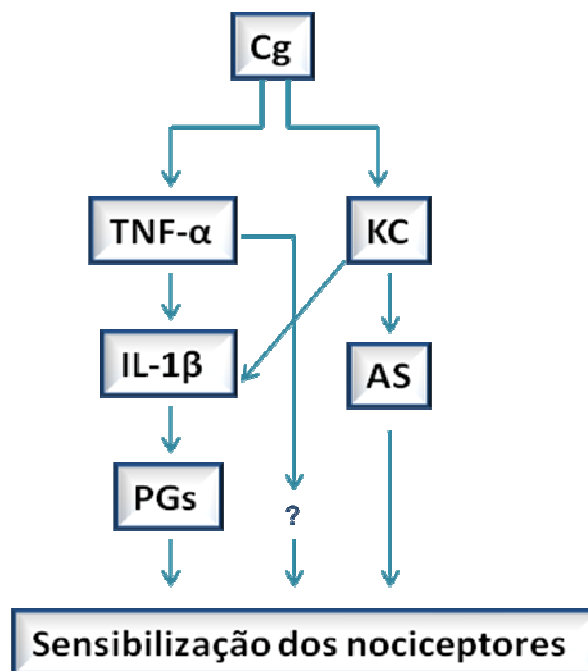
A administração intraplantar de Cg ou LPS estimulam duas importantes vias da hipernocicepção inflamatória. A primeira inicia-se com a produção de BK, que estimula a produção de TNF- $\alpha$ . Esta citocina faz com que haja liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$  que ativam a COX-2 resultando na produção de PGE<sub>2</sub> principalmente (TNF- $\alpha$   $\rightarrow$  IL-6 e IL-1 $\beta$   $\rightarrow$  PGE<sub>2</sub>). Na segunda via o TNF- $\alpha$  ativa a liberação de quimiocinas (IL-8/CXCL8 em humanos, CINC-1 em ratos, KC em camundongos), que estimulam a liberação/produção de aminas simpáticas (TNF- $\alpha$   $\rightarrow$  quimiocinas  $\rightarrow$  aminas simpáticas) (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991; 1992; FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; FERREIRA et al., 1993; LORENZETTI et al., 2002).

Cunha et al. (2005) demonstraram diferenças entre ratos e camundongos na cascata de mediadores descrita acima. Em camundongos a BK ativa diretamente a produção de PGE<sub>2</sub> e aminas simpáticas (AS), independentemente de citocinas. Já em ratos, como dito acima, a produção destes mediadores é dependente de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Outra diferença importante é que o TNF- $\alpha$  estimula ambas as vias em ratos e somente a via das prostaglandinas em camundongos. Além disso, TNF- $\alpha$  parece atuar diretamente na sensibilização dos nociceptores em camundongos. Já CINC-1 estimula somente o componente simpático em ratos, enquanto KC estimula ambas as vias hipernociceptivas em camundongos (Figura 2).

Os mediadores envolvidos na gênese da dor inflamatória também desempenham um papel fundamental no desencadeamento de outros eventos inflamatórios, incluindo edema e migração de leucócitos. As PGs podem ser cruciais para a formação de edema e as citocinas relevantes para o recrutamento de células em vários modelos de inflamação (CUNHA et al., 1992; FERREIRA, 1993; WHITE et al., 2005). Há evidências de que estes eventos podem ocorrer independentemente uns dos outros, pois estudos mostram que anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) não interferem na migração de leucócitos, mas inibem a formação de edema e dor (MONCADA; FERREIRA; VANE, 1973; LUKKARINEN et al., 2006; CANETTI et al., 2001; BOMBINI et al., 2004; FORD-HUTCHINSON et al., 1984). Também tem sido demonstrado que a migração de leucócitos pode ser essencial para o aumento da

permeabilidade vascular e conseqüentemente formação de exsudado, e ainda indução da dor por certos estímulos inflamatórios (WEDMORE; WILLIAMS, 1981; ISSEKUTZ, 1984; LEVINE et al., 1984).

**Figura 2: Diagrama mostra a seqüência de liberação de mediadores inflamatórios iniciados pela carragenina, intermediada por citocinas e indução final de prostanóides (PGs) e aminas simpáticas (AS) em camundongos.**



Fonte: Modificado de Cunha et al., 2005.

Diversos trabalhos na literatura demonstram experimentalmente os efeitos nociceptivos e ainda uma relevante atividade quimiotática dos mediadores BK, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . As citocinas (TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ ) aumentam a permeabilidade do endotélio vascular e a expressão de moléculas de adesão como a E-selectina e ICAM-1, favorecendo a migração celular. Os eicosanóides também aumentam a expressão de moléculas de adesão (WONG; PRAMEYA; DOROVINI-ZIS, 1999). Leucotrieno do tipo LTB<sub>4</sub> em experimentos de hipernocicepção sua ação hipernociceptiva quando se depleta leucócitos. Esse fenômeno também é observado com C5a e fMLP. Isso nos indica a importante função destas células no desenvolvimento da dor por estes mediadores (LEVINE et al., 1994, 1984, 1985).

A interação no ambiente inflamatório entre neutrófilos recrutados, células residentes (macrófagos, mastócitos e fibroblastos) e mediadores locais amplifica a

produção e liberação de vários outros mediadores, incluindo citocinas, enzimas, espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e metaloproteases. Todos estes produtos contribuem para uma situação caracteristicamente pró-nociceptiva (KASAMA et al., 2005; PALMER; GABAY; IMHOF, 2006; CATTANI et al., 2006; TANAKA, 2006; KIM et al., 2006).

Há mais de 30 anos foi publicado o primeiro trabalho que mostrava atividade pró-nociceptiva dos neutrófilos (CASTRO et al., 1979). Levine et al. (1984, 1985) mostrou que a injeção intraplantar de LTB<sub>4</sub>, C5a ou fMLP na pata de ratos promovia hipernocicepção mecânica que dependia diretamente da migração de polimorfonucleares. Outras pesquisas demonstraram que a hipernocicepção térmica induzida pelo fator de crescimento do nervo, mediador pró-nociceptivo bem conhecido, foi inibido depois de depletar neutrófilos em ratos (BENNET et al., 1998; FOSTER et al., 2003). Em humanos foi demonstrado também uma íntima associação entre o efeito hiperalgésico de LTB<sub>4</sub> e migração de neutrófilos (BISGAARD; KRISTENSEN, 1985). Ribeiro et al. (2000a) demonstraram que o efeito pró-nociceptivo do ácido acético administrado por via intraperitoneal é atenuado quando se depleta células residentes da cavidade peritoneal dos animais.

Algumas evidências experimentais sugerem que o NO possui uma ação moduladora da nocicepção através da formação de GMPc. Estas evidências foram reforçadas mediante as observações de que as substâncias capazes de liberar NO, como o nitroprussiato de sódio e nitroglicerina, bloqueiam a hiperalgesia induzida pela Cg e PGE<sub>2</sub> e que a analgesia produzida por estas drogas pode ser bloqueada pelos antagonistas da NOS (L-NMMA, L-NIO, L-NAME), ou ainda por um inibidor da guanilato ciclase (FERREIRA, 1993).

Parece que o NO exerce atividade moduladora sobre a atividade da COX-2. A liberação de grande quantidade de NO pela NOS pode inibir a indução da COX-2 e suprimir a formação dos metabólitos da COX o que contribui para redução da intensidade do processo de inflamação crônica e dor (VANE; BOTTING, 1995). O NO também participa da dessensibilização do receptor da bradicinina, interrompendo, dessa forma, a atividade nociceptiva e hiperalgésica deste importante mediador inflamatório (DRAY, 1993).



## 2 JUSTIFICATIVA

A utilização da natureza para fins terapêuticos é tão antiga quanto à civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, de plantas e animais foram fundamentais para a área da saúde. Historicamente, as plantas medicinais são importantes como fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos, estando no reino vegetal a maior contribuição de medicamentos.

*Calotropis procera* é uma planta laticífera encontrada facilmente no território cearense e é utilizada pela população local para alguns fins terapêuticos, como dor de dente, diabetes, infecções de pele, entre outras. Na medicina tradicional indiana, essa planta também tem sido utilizada por muito tempo para diversas patologias incluindo lepra, úlceras, tumores, hemorroidas, dores nas articulações e doenças do baço, fígado e abdômen (KIRTIKAR; BASU, 1935). Na pesquisa, inúmeros estudos mostram que o látex de *C. procera*, rico em proteínas, apresenta propriedades farmacológicas anti-inflamatórias, antinociceptiva, imuno-modulatória envolvendo mecanismos celulares, vasculares e liberação ou inibição de importantes mediadores inflamatórios (ALENCAR et al., 2006; 2004; RAMOS et al., 2009; SOARES et al., 2005; KUMAR et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009; LIMA-FILHO et al., 2010).

Apesar do grande número de analgésicos e antiinflamatórios disponíveis atualmente para uso clínico, ainda não dispomos do analgésico ideal, com maior especificidade, de menor toxicidade e com indicação para algumas modalidades de dor ainda de difícil terapêutica, notadamente as de origem neurogênicas. Entretanto, o desenvolvimento da biologia molecular tem contribuído para o grande progresso na descoberta das drogas analgésicas mais modernas.

Neste contexto, o interesse incessante por tratamentos farmacológicos alternativos em processos inflamatórios e dolorosos que apresentem menores efeitos colaterais, melhor eficácia e menor custo, aliado aos conhecimentos populares e científicos da planta *C. procera*, são suportes para a realização de estudos que possibilitem a investigação de efeitos analgésico e/ou antiinflamatórios de uma fração proteica isolada desta planta em diferentes modelos experimentais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de uma fração proteica isolada a partir do látex de *Calotropis procera* (LP) em modelos experimentais de hipernocicepção inflamatória mecânica, bem como os possíveis mediadores e mecanismos envolvidos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito de LP na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por agente inflamatório inespecífico (carragenina). Investigar o envolvimento de neutrófilos e mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC, NO e PGE<sub>2</sub>) neste efeito;
- ✓ Investigar o efeito de LP na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por mediadores inflamatórios (prostaglandina E<sub>2</sub> e epinefrina). Avaliar o papel da via Arginina/NO/canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> neste efeito;
- ✓ Estudar o efeito de LP na hipernocicepção inflamatória persistente induzida por CFA, bem como sobre o edema e infiltração de neutrófilos induzidos por CFA;

## 4 MATERIAIS

### 4.1 Isolamento da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (Ait) R. Br.

As proteínas utilizadas nesse trabalho foram extraídas do látex da planta *Calotropis procera* (Ait) R. Br. (Apocynaceae). Esta espécie vegetal foi identificada pelo Prof. Dr. Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde o exemplar de exsicata N. 32.663 foi depositado.

Este arbusto foi facilmente encontrado em várias localidades da cidade de Fortaleza, principalmente na área litorânea. A coleta do látex foi realizada através de incisões no ápice caulinar de plantas saudáveis em tubos do tipo Falcon com água destilada (1:1 v/v). O procedimento de coleta do látex em água minimiza o efeito natural de “coagulação” que ocorre nesse fluido logo após sua exsudação. Após a coleta, os tubos foram levemente agitados e mantidos à temperatura ambiente até o seu processamento no laboratório.

O processamento do látex foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos. Inicialmente, o látex foi submetido à centrifugação a 5.000 x g; 10 °C por 10 minutos e o precipitado obtido, constituído principalmente de borracha, foi descartado. O sobrenadante foi, então, submetido à diálise contra água destilada (1:10 v/v) a 8 °C durante 60 horas, com trocas da água a cada 4 horas, utilizando uma membrana de diálise com capacidade de retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da. Em seguida, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriores, e um sobrenadante límpido, rico em proteínas e destituído de borracha foi obtido. Esta fração, designada como Proteínas do Látex (LP), foi liofilizada e utilizada nos experimentos realizados neste trabalho (RAMOS et al., 2009).

## 4.2 Animais experimentais

Os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) fêmeas de 25 a 30g, n=5-6 animais, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas, sob condições adequadas de luz (ciclo claro/escuro) e temperatura, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

Os protocolos utilizados neste trabalho estão de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética da Universidade Federal do Ceará sob o número de processo 61/11.

## 4.3 Drogas e reagentes

- Adjuvante completo de Freud (Sigma);
- Anticorpo biotinilado de interleucina 1 (Dako);
- Anticorpo biotinilado de TNF- $\alpha$  (Dako);
- Anticorpo biotinilado de KC (Dako);
- Carragenina (Sigma);
- Cloridrato de naloxona (Narcan<sup>®</sup>, Cristália);
- Dexametasona (Aché);
- Diazóxido (Sigma);
- DMSO – Dimetilsulfóxido (Vetec);
- Epinefria (Sigma);
- Etanol (Synth);
- Glibenclamida (Sigma);
- HTAB (Brometo de hexadecil trimetil-amônio) (Sigma);
- Indometacina (Sigma);
- L-Arginina (Sigma);
- L-NAME (Sigma);
- NADPH (Sigma);

- Need (Sigma);
- Nitrato redutase;
- Nitrito de sódio;
- O-dianisidine (Sigma);
- Peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Prostaglandina E2 (Sigma);
- Solução salina – Cloreto de sódio estéril a 0,9% (Gaspar Viana S/A);
- Sulfanilamida (Sigma);
- Sulfato de morfina (Dimorf<sup>®</sup>, Cristália);
- Tween 20 (Vetec).

#### 4.4 Equipamentos e materiais

- Agitador para tubos de ensaio mod. TE089 (MARCON);
- Balança analítica digital, modelo Ay220 (Shimadzu);
- Balança para pesagem dos animais, modelo SF-400 (Kitchenscale);
- Banho-maria, modelo 100 (FANEN);
- Centrífuga refrigerada, modelo marathon 26 KMR (Fisher Scientific)
- Citocentrífuga, modelo 2000D (Cientec);
- Estufa, modelo MA033 (Marconi)
- Homogeneizador (Ultra Surrer);
- Microcâmara de 48 poços (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD);
- Microscópio óptico binocular, modelo 021 (Quimis<sup>®</sup>);
- Placa quente (Insight);
- Pletismógrafo, modelo Le 7500 (Panlab);
- Rota Rod (Insight);
- Von Frey eletrônico (Insight).

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Método de Avaliação da Hipernocicepção: Pressão crescente na pata (Von Frey eletrônico)

Em todos os modelos a avaliação da hipernocicepção mecânica foi realizada pelo método de pressão crescente na pata dos animais através do Von Frey eletrônico, uma versão modificação por Cunha et al. (2004) da versão descrita por Frey em 1896.

No Von Frey eletrônico, utiliza-se de um anesthesiômetro eletrônico que é composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas (g). Ao transdutor foi adaptada uma ponteira com área  $0.05 \text{ mm}^2$  que estimula diretamente a pata. Os animais são colocados em caixas de acrílico, medindo  $12 \times 10 \times 17 \text{ cm}$  cujo assoalho é uma rede de malha igual a  $5 \text{ mm}^2$  constituída de arame não maleável, durante 10 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. O experimentador é treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual provoca uma resposta de flexão característica com retirada da pata (comportamento nociceptivo → “flinche”). O estímulo é interrompido após a observação da resposta característica, descrita acima. Foram realizadas três medidas distintas para cada animal, sendo calculada a média aritmética destes valores.

A intensidade de hipernocicepção é quantificada através da variação da pressão aplicada na pata ( $\Delta$  limiar de estímulo em gramas). Este delta é obtido a partir da subtração do valor medido antes dos tratamentos (medida basal – T0) e após administração dos estímulos e droga teste que variam de acordo com o protocolo experimental, explicados a seguir.

### 5.2 Modelos Experimentais de Hipernocicepção Mecânica

#### 5.2.1 Avaliação do efeito de LP na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina (Cg)

A hipernocicepção mecânica foi avaliada nos tempos 0, 3 e 5 horas após a administração intraplantar (i.pl.) de Cg ( $300 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$  de salina) nos animais pré-tratados por via endovenosa (e.v., através do plexo intra-orbital) com LP (0,5; 5 e  $50 \text{ mg/kg}/100 \mu\text{L}$  de salina); com indometacina por via intraperitoneal ( $5 \text{ mg/Kg}/100 \mu\text{L}$ , i.p.), inibidor não-seletivo da COX; e salina (e.v.,  $100 \mu\text{L}$ ) 30 minutos antes da administração da Cg na pata traseira direita de cada camundongo. O grupo controle

negativo foi formado por animais tratados com salina por via i.pl. e e.v. A intensidade de hipernocicepção mecânica foi medida conforme descrito (item 01) e calculada pela subtração das medidas (pressão/g) coletadas ( $\Delta_1 = T_0 - T_1$ ;  $\Delta_2 = T_0 - T_3$  e  $\Delta_3 = T_0 - T_5$ ).

a) *Efeito de LP sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção induzida por carragenina (Cg):*

Os animais foram tratados e.v. com LP nas duas doses que apresentaram efeito antinociceptivo (5 e 50 mg/Kg/100 $\mu$ L de salina) e salina (100 $\mu$ L), 30 min antes da Cg i.pl. (300 $\mu$ g/50 $\mu$ L de salina). O grupo controle negativo foi formado por animais tratados com salina i.pl. e e.v..

Três horas após a administração da Cg, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o tecido subcutâneo plantar das patas foi coletado e armazenado à -70°C para posterior quantificação da atividade de MPO conforme metodologia descrita por Cunha e colaboradores (2008c), descrita a seguir.

#### Quantificação da Atividade de MPO

No momento da dosagem as amostras de tecido foram descongeladas e incubadas em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio) na proporção de 50 mg de tecido por mL, homogeneizados e centrifugados (1500g/15 min a 4°C). O sobrenadante obtido foi transferido para um eppendorf e submetido ao choque térmico no pellet de células em três etapas de congelamento e descongelamento (-20°C; 10 minutos cada). O sobrenadante foi novamente homogeneizado e centrifugado (1500xg; 15 min a 4°C) para melhor remoção de contaminantes. Em seguida, as amostras foram plaqueadas (duplicatas de 7 $\mu$ L em placas de 96 poços) e adicionado 200 $\mu$ L da solução de leitura (5mg O-dianisidine; 15 $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%; 3mL tampão fosfato; 27mL H<sub>2</sub>O). A leitura da absorbância foi obtida a 460nm (t<sub>0</sub>=0 min e t<sub>1</sub>=1 min) em leitor de ELISA. A mudança na absorbância foi plotada em uma curva padrão de neutrófilos, expressa como neutrófilos/mg de tecido e interpretada como atividade da enzima mieloperoxidase.

b) *Efeito de LP sobre a produção de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), quimiocina (KC) e prostaglandina (PGE2) na hipernocicepção induzida por carragenina (Cg):*

Três horas após a administração da Cg, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o tecido subcutâneo plantar das patas foi coletado e armazenado à -70°C para posterior quantificação conforme metodologias de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) descritas á seguir:

#### Quantificação de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ e KC

Um ELISA tipo sanduíche foi realizado para quantificar as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e KC nas amostras de tecido da pata dos animais. Para tanto, o tecido coletado foi homogeneizado em solução de PBS e processado como descrito por Safieh-Garabedian et al (1995). A detecção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e KC foram determinadas no sobrenadante do macerado da amostra por ELISA (CUNHA et al., 2000). Placas de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-IL-1, anti-TNF- $\alpha$  e anti-KC murino (4 $\mu$ g/mL ou 0,8 $\mu$ g/mL; kit da R&D systems- Cat. N° DY501 ou DY510, respectivamente). Após sensibilização das placas, as amostras foram adicionadas em duplicata e a curva padrão foi adicionada em várias diluições e incubada por 24h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05%) e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$  e anti-KC diluídos (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50  $\mu$ L do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 15 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 $\mu$ L) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a 37°C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) e a densidade óptica medida a 490nm em espectrofotômetro. As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante/mg de tecido.



### Quantificação de PGE<sub>2</sub>

As amostras dos tecidos plantares foram coletadas em 0,5 mL de tampão contendo inibidores de enzima e inibidor da cicloxigenase (indometacina). Depois de homogeneizadas as amostras com auxílio do Polytron, estas foram centrifugadas (20 min, 2000 g, 4 °C), e o sobrenadante foi analisado por radio imunensaio para determinar a concentração de PGE<sub>2</sub> (WALLACE et al., 1988).

#### 5.2.2 Avaliação do efeito de LP na hipernocicepção induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

A hipernocicepção mecânica foi avaliada três horas após a administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100ng/50µL de salina) nos animais pré-tratados e.v. com LP (5 e 50 mg/kg) e salina (100µL) 30 minutos antes da administração da PGE<sub>2</sub> em cada pata direita traseira. O grupo controle negativo foi formado por animais tratados i.pl. e e.v. com salina. A intensidade de hipernocicepção foi medida conforme descrito (item 01) e calculada a partir da subtração das medidas (pressão/g) coletadas ( $\Delta = T_0 - T_3$ ).

##### *a) Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito anti-hipernociceptivo de LP na hipernocicepção induzida por PGE<sub>2</sub>:*

Os camundongos foram tratados com salina (e.v. e i.pl., grupo controle negativo); L-NAME (30mg/kg/100µL de salina, i.p.); L-Arginina (400mg/kg/100µL de salina, i.p.), precursor de óxido nítrico; L-NAME juntamente com L-Arginina (L-NAME administrado 15 minutos antes da L-Arginina); LP (5mg/kg, e.v.); e L-NAME em conjunto com LP (L-NAME administrado 15 minutos antes de LP). Após 30 minutos receberam PGE<sub>2</sub> (100ng/50µL, i.pl.) e depois de 3 horas os camundongos foram analisados no Von Frey eletrônico (T3). A intensidade de hipernocicepção foi medida como descrito anteriormente (item 01) e obtida a partir da subtração das medidas (pressão/g) coletadas ( $\Delta = T_0 - T_3$ ).

##### *b) Avaliação do envolvimento dos canais de potássio ATP dependentes ( $K^+_{ATP}$ ) no efeito anti-hipernociceptivo de LP na hipernocicepção induzida por PGE<sub>2</sub>:*

Os camundongos foram tratados com salina (e.v. e i.pl., grupo controle negativo); glibenclamida (5mg/kg/100µL de DMSO 5%, i.p.), droga padrão utilizada para bloquear os canais de  $K^+_{ATP}$ ; diazóxido (3mg/kg/100µL de DMSO 5%, i.p.), droga padrão utilizada para ativar canais de  $K^+_{ATP}$ ; LP (5mg/kg, e.v.) e solução de DMSO 5% (100µL, i.p.) que foi utilizado no preparo da glibenclamida e do diazóxido. Após 30 minutos destas administrações a  $PGE_2$  (100ng/50µL, i.pl.) foi aplicada e 3 horas depois os camundongos foram analisados no Von Frey eletrônico (T3). A intensidade de hipernocicepção foi obtida a partir da subtração das medidas (pressão/g) coletadas ( $\Delta = T0-T3$ ).

### 5.2.3 Avaliação do efeito de LP na hipernocicepção induzida por epinefrina

A hipernocicepção mecânica foi avaliada duas horas após a administração intraplantar de epinefrina (100ng/50µL de salina) nos animais pré-tratados e.v. com LP (5 mg/kg) e salina (100µL) 30 minutos antes da administração da epinefrina em cada pata direita traseira. O grupo controle negativo foi formado por animais tratados com salina i.pl. e e.v.. A intensidade de hipernocicepção foi medida conforme descrito (item 01) e calculada a partir da subtração das medidas (pressão/g) coletadas ( $\Delta = T0-T3$ ).

### 5.2.4 Investigação do efeito de LP no modelo de hipernocicepção persistente induzida por adjuvante completo de Freud (CFA)

CFA (1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inativado, diluído em 85% de óleo de parafina e 15% de monooleato de manida) quando administrado uma única vez na pata de roedores, produz inflamação que persiste por mais de oito dias (LARSON *et al.*, 1985). Por esta razão, os animais foram analisados durante sete dias consecutivos.

Os animais foram tratados durante oito dias com salina (e.v.); dexametasona (2mg/kg/100µL de salina) por via subcutânea (s.c.) e LP (5mg/kg, e.v.). Apenas no 1º dia de experimento os animais receberam CFA (20µL, i.pl.) em cada pata 30 minutos após aplicação de cada droga.

Diariamente, após 3 horas dos tratamentos os animais foram desafiados no Von Frey eletrônico, sempre no mesmo horário do primeiro dia.

A intensidade de hipernocicepção foi medida conforme descrito (item 01) e calculada a partir da subtração das medidas (pressão/g) coletadas.

*a) Efeito de LP sobre o edema de pata na hipernocicepção induzida por CFA:*

Diariamente, logo após a avaliação da hipernocicepção mecânica, os volumes das patas direitas de cada animal foram medidos através do pletismógrafo durante sete dias. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pelas patas após administração de CFA e antes de qualquer tratamento (T0). Os resultados foram expressos em volume de edema (mL).

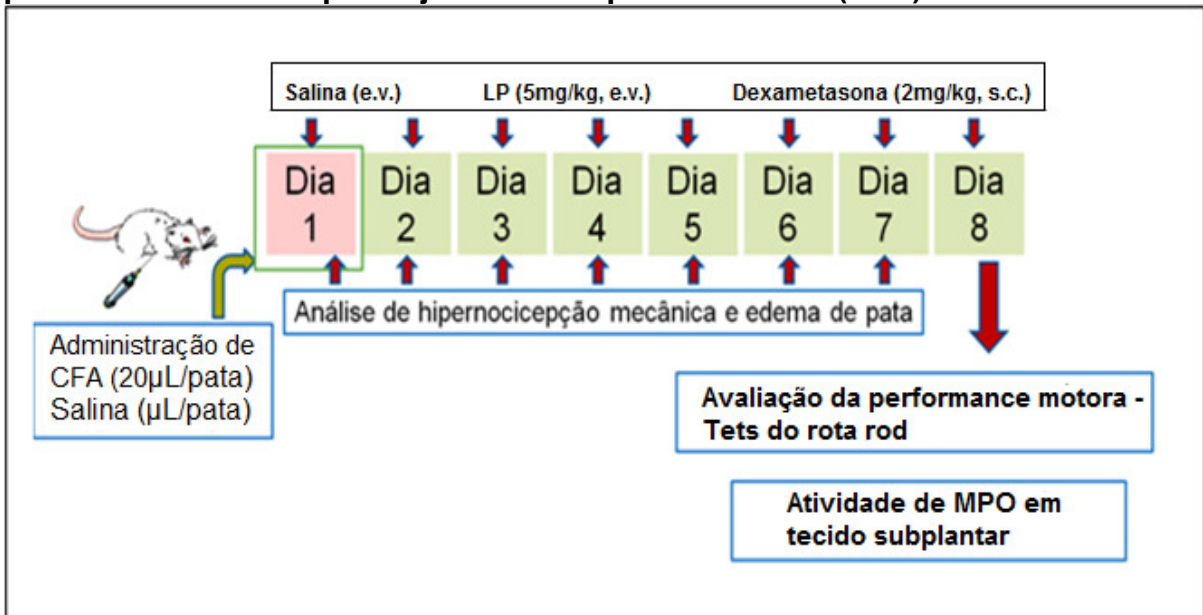
*b) Efeito de LP sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção induzida por CFA:*

No oitavo dia de experimento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o tecido subcutâneo plantar das patas foi coletado e armazenado à -70°C para posterior quantificação da atividade de MPO conforme metodologia descrita acima (item 5.2.1.a).

*c) Avaliação do efeito de LP sobre o desempenho motor dos camundongos através do teste rota rod:*

Objetivando avaliar possível efeito inespecífico de LP (5mg/kg, e.v.) sobre a incoordenação motora ou relaxamento muscular dos animais, no oitavo dia de experimento os camundongos foram colocados individualmente posicionados no aparelho de rota rod (4 rotações por minuto) e o tempo de permanência foi registrado (máximo 2 minutos). Os resultados foram expressos como o tempo (em segundos) de permanência do animal no aparelho  $\pm$  E.P.M. (DUNHAM; MYIA, 1957).

**Figura 3: Protocolo experimental para avaliação do efeito da fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (LP) em modelo de hipernocicepção persistente induzida por adjuvante completo de Freud (CFA).**



Fonte: pesquisador.

### 5.3 Análises estatísticas

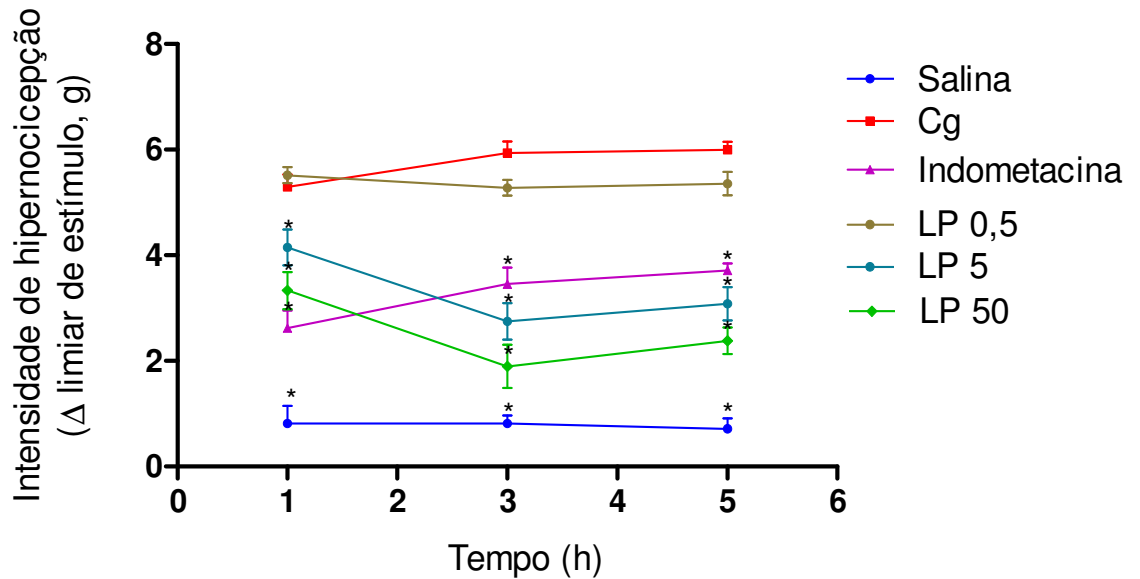
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (Erro Padrão da Média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. Para todas as análises foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg)

Animais tratados apenas com Cg (i.pl.) apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da hipernocicepção mecânica quando comparados àqueles tratados apenas com salina (i.pl., e.v., controle). Podemos observar na figura 04 que LP quando administrada nas duas maiores doses reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a hipernocicepção mecânica quando comparada ao grupo tratado com Cg (i.pl.). Este efeito foi observado em todos os tempos de avaliação experimental. Na primeira, terceira e quinta hora a dose de 5mg/kg de LP diminuiu a hipernocicepção em 25%, 55% e 46%, respectivamente, e a dose de 50 mg/kg reduziu em 39%, 64% e 60 %, respectivamente. O efeito de LP nestas doses foi semelhante ao observado pelo tratamento com a droga utilizada como padrão, indometacina (i.p.), que reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a hipernocicepção em 52%, 44% e 38% na primeira, terceira e quinta hora após administração i.pl. do estímulo inflamatório. Por outro lado, a menor dose de LP (0,5mg/kg) não foi eficiente em reduzir a hipernocicepção.

**Figura 4: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg).**

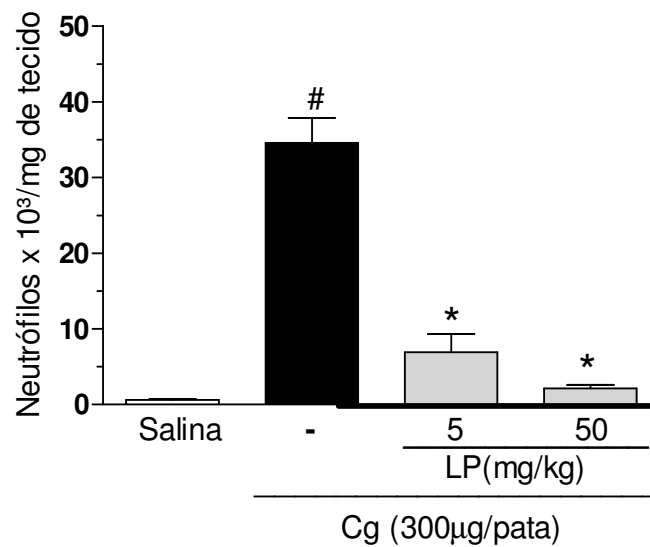


Animais foram tratados com salina (e.v. e i.pl.), indometacina (5mg/kg, i.p.) ou LP (0,5; 5 e 50mg/kg, e.v.) 30 minutos antes da injeção de Cg (300µg/pata). Após 1h, 3h e 5h da administração do estímulo inflamatório, os animais foram desafiados no Von Frey eletrônico. Resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupos. \*  $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com grupo Cg. (ANOVA, teste de Bonferroni).

a) LP reduz migração de neutrófilos induzida por carragenina (Cg) na pata de camundongos:

A migração de neutrófilos foi mensurada através da dosagem de MPO no tecido da pata estimulada por Cg (300µg/pata). A administração intraplantar deste estímulo inflamatório provocou significativo ( $p < 0,05$ ) acúmulo de neutrófilos em tecido subplantar quando comparado ao grupo tratado somente com salina (e.v., i.pl., controle). Esta atividade foi reduzida de forma significativa ( $p < 0,05$ ) nos grupos de animais tratados por via endovenosa com LP nas doses de 5 e 50 mg/Kg, as quais foram efetivas em reduzir intensamente o influxo de neutrófilos em 80% e 94%, respectivamente, quando comparadas ao grupo tratado com Cg (i.pl.) (Figura 5).

**Figura 5: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz migração de neutrófilos induzida por carragenina (Cg) na pata de camundongos.**



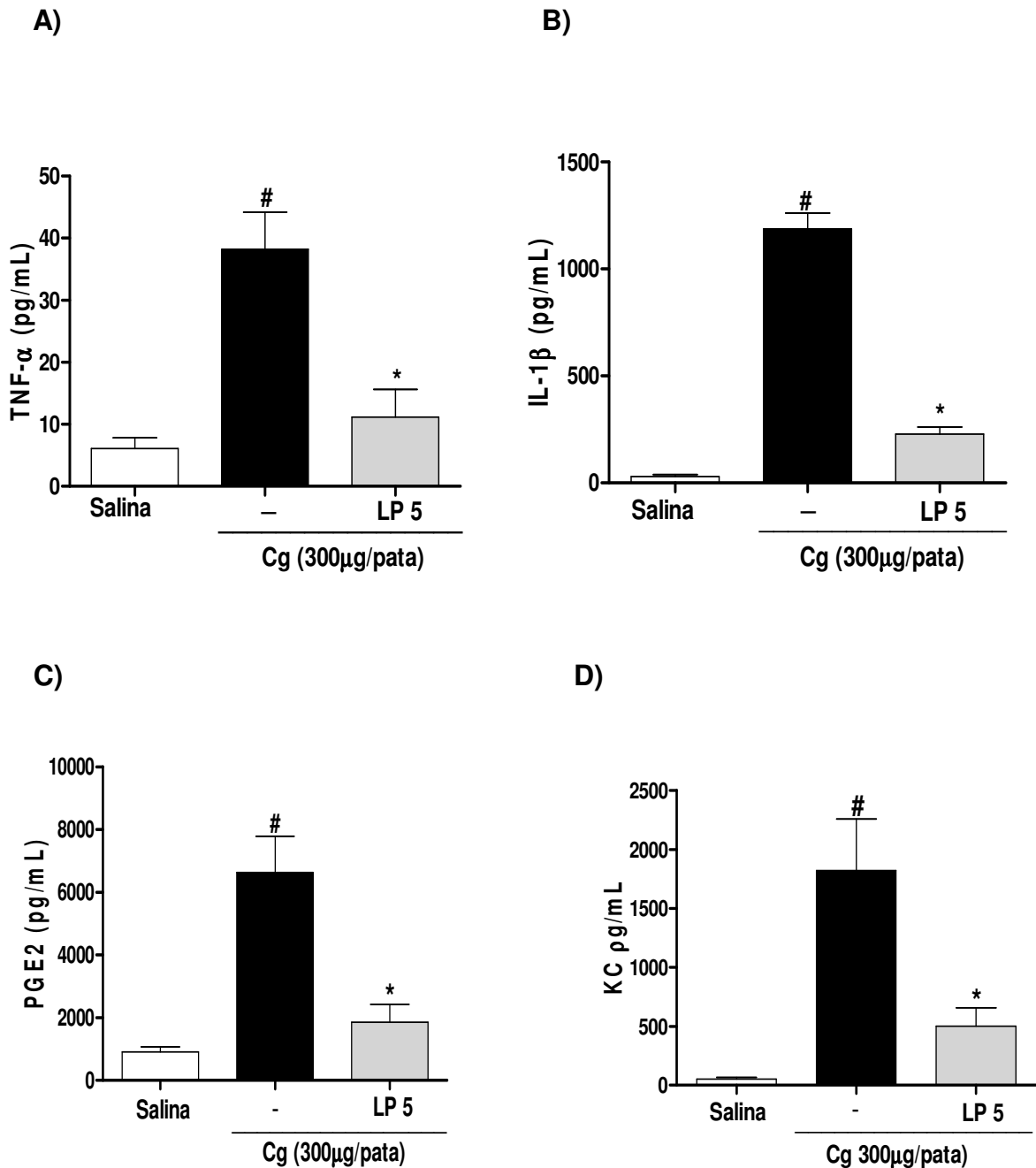
Camundongos foram tratados com salina (e.v., i.pl.) ou LP (5 e 50mg/kg, e.v.) 30 minutos antes da injeção de Cg (300µg/pata). Após 3h da administração do estímulo inflamatório, os animais foram sacrificados e o tecido subplantar foi retirado para quantificação de MPO. Resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupos. #  $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com grupo Salina e \*  $p < 0,05$  com grupo Cg. (ANOVA, teste de Bonferroni).

- b) LP reduz a concentração de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e PGE<sub>2</sub>) no tecido subplantar de patas estimuladas com carragenina (Cg):

Em busca de avaliar possível envolvimento de mediadores pró-inflamatórios no efeito antinociceptivo de LP frente à hipernocicepção mecânica causada pela administração intraplantar de Cg (300µg/pata), foram quantificadas as citocinas, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; quimiocina, KC e PGE<sub>2</sub> em patas estimuladas com Cg de camundongos tratados previamente com LP na dose de 5mg/kg (e.v.).

Animais que receberam somente Cg na pata demonstraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) destes mediadores quando comparados ao grupo tratado apenas com salina (e.v., i.pl., controle). O pré-tratamento com LP foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a concentração plantar de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e PGE<sub>2</sub> em 71%, 81%, 72% e 72%, respectivamente, quando comparado ao grupo Cg (i.pl.) (Figura 6 A-D).

**Figura 6: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz a concentração de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e PGE<sub>2</sub>) no tecido subplantar de patas estimuladas com carragenina (Cg).**



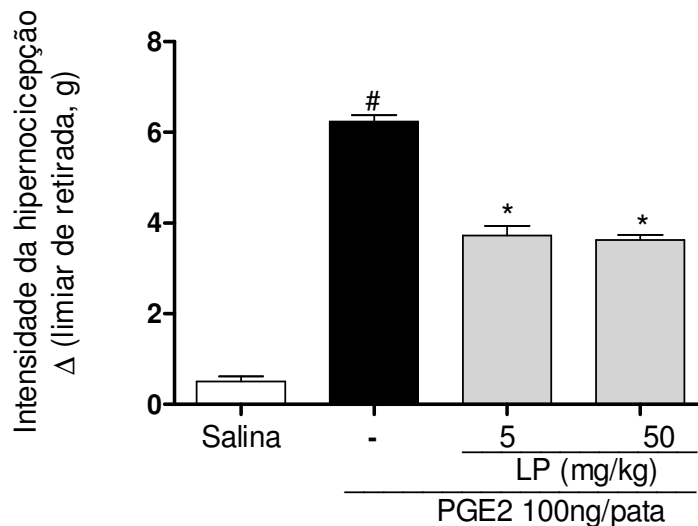
Camundongos foram tratados com salina (e.v., i.pl.) ou LP (5 mg/kg, e.v.) 30 minutos antes da injeção i.pl. de Cg (300 $\mu$ g/pata). Após 3h da administração de Cg os animais foram sacrificados e o tecido subplantar foi retirado para quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e PGE<sub>2</sub>. Resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais por grupos. #  $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com grupo Salina e \*  $p < 0,05$  com o grupo Cg. (ANOVA, teste de Bonferroni).



## 6.2 Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz hipernocicepção inflamatória induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

A administração intraplantar de PGE<sub>2</sub> (100ng/pata) promoveu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da hipernocicepção mecânica quando comparado aos camundongos que receberam somente salina (e.v., i.pl., controle). LP, previamente administrado e.v. nas doses de 5 e 50mg/kg, diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a hipernocicepção mecânica em 40% e 42%, respectivamente, quando comparados ao grupo PGE<sub>2</sub> (Figura 7).

**Figura 7: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).**



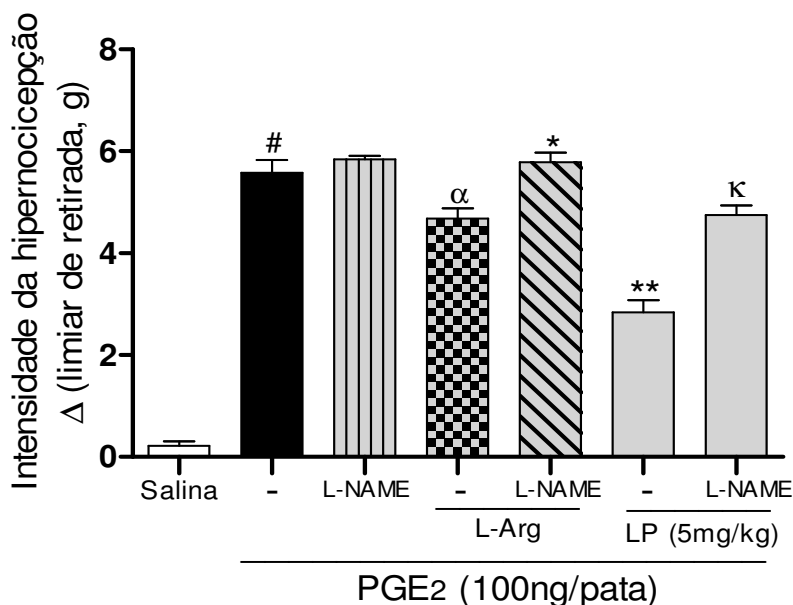
Salina (e.v., i.pl.) ou LP nas doses 5 e 50mg/kg (e.v.) foram administrados 30 minutos antes da injeção intraplantar (i.pl) de PGE<sub>2</sub> (100ng/pata) e após 3 horas os animais foram desafiados no Von Frey eletrônico. Resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupos. #  $p < 0,05$  indica diferença estatística quando comparado ao grupo salina e \*  $p < 0,05$  ao grupo PGE<sub>2</sub>. (ANOVA, teste de Bonferroni).

a) Efeito anti-hipernociceptivo da LP em hipernocicepção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> depende da produção de NO: L-NAME reverte sua atividade.

Animais tratados com PGE<sub>2</sub> i.pl. (100ng/pata) demonstraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da hipernocicepção mecânica quando comparados àqueles tratados apenas com salina (i.pl., e.v., controle). Grupo tratado com L-Arginina (30mg/kg, i.p.), demonstrou diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da hipernocicepção mecânica em 16% quando comparado ao grupo PGE<sub>2</sub>. Este efeito é perdido quando é administrado previamente L-NAME (30mg/kg, i.p.) 15 minutos antes de L-Arginina (grupo L-NAME+L-Arginina).

O tratamento prévio de LP (5mg/kg, e.v.) mostrou redução significativa ( $p < 0,05$ ) da hipernocicepção em 49% quando comparado ao grupo PGE<sub>2</sub>. Esta atividade foi perdida quando foi L-NAME foi administrado 15 minutos antes de LP (grupo L-NAME+LP), observando diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o grupo LP e L-NAME+LP (Figura 8).

**Figura 8: Efeito anti-hipernociceptivo da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) em hipernocicepção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> depende da produção de NO: L-NAME reverte sua atividade.**



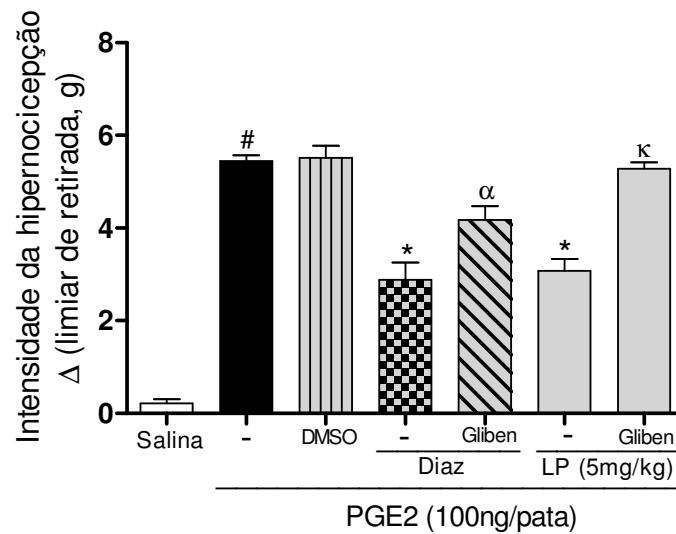
Camundongos foram tratados com salina (e.v., i.pl.); L-NAME (30mg/kg, i.p.); L-Arginina (L-Arg, 400mg/kg, i.p.); L-NAME juntamente com L-Arginina; LP (5mg/kg, e.v.) e LP juntamente com L-NAME 30 minutos antes da injeção de PGE<sub>2</sub> (100ng, i.pl.). Após 3 horas da administração do estímulo nociceptivo os camundongos foram desafiados no Von Frey eletrônico. Resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupos. #  $p < 0,05$  indica diferença estatística quando comparado ao grupo salina,  $\alpha$   $p < 0,05$  ao grupo L-NAME, \*  $p < 0,05$  ao grupo L-Arg, \*\*  $p < 0,05$  ao grupo PGE<sub>2</sub> e  $\kappa$   $p < 0,05$  ao grupo LP5. (ANOVA, teste de Bonferroni).

- b) Efeito anti-hipernociceptivo da LP em hipernocicepção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> depende dos canais de K<sub>ATP</sub>: glibenclamida reverte sua atividade.

O agente hiperalgésico, PGE<sub>2</sub> (100ng/pata), quando administrado por via intraplantar, induziu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da hipernocicepção mecânica quando comparado ao grupo tratado apenas com salina (e.v., i.pl.). Já os animais pré-tratados com DMSO (5%) não apresentaram nenhum efeito significativo. Grupo tratado com diazóxido demonstrou diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da hipernocicepção em 47% quando comparado ao grupo tratado com PGE<sub>2</sub> (i.pl.). Este efeito é perdido quando é administrado previamente glibenclamida (15 minutos antes de diazóxido).

O pré-tratamento com LP na dose de 5mg/kg (e.v.) 30 minutos antes de PGE<sub>2</sub> demonstrou redução significativa da hipernocicepção em 43% quando comparado ao grupo PGE<sub>2</sub> (i.pl.). Esta atividade foi perdida quando foi administrado glibenclamida 15 minutos antes de LP (grupo glibenclamida+LP), observando diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados com LP e glibenclamida em conjunto com LP (Figura 9).

**Figura 9: Efeito anti-hipernociceptivo da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) em hipernocicepção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> depende dos canais de K<sub>ATP</sub>: glibenclamida reverte sua atividade.**

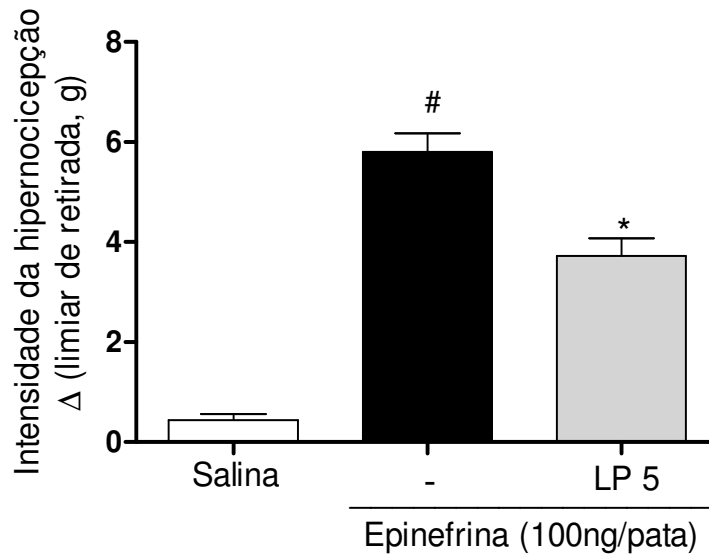


Camundongos foram tratados com salina (e.v., i.pl.); DMSO (5%, i.p.); diazóxido (Diaz, 3mg/kg, i.p.); glibenclamida (Gliben, 5mg/kg, i.p.); glibenclamida juntamente com diazóxido; LP (5mg/kg, i.v.) e glibenclamida juntamente com LP. Após 30 minutos destas administrações, a PGE<sub>2</sub> (100ng, i.pl.) foi aplicada e 3 horas depois os camundongos foram analisados no Von Frey eletrônico. Resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 5 animais por grupos. # p<0,05 indica diferença estatística quando comparado ao grupo salina, \* p<0,05 ao grupo PGE<sub>2</sub>, α p<0,05 ao grupo Diaz e κ p<0,05 ao grupo LP. (ANOVA, teste de Bonferroni).

### **6.3 Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz hipernocicepção mecânica induzida por epinefrina**

Animais tratados i.pl. com epinefrina (100ng/pata) promoveram aumento da intensidade de hipernocicepção de forma significativa quando comparados àqueles que receberam apenas salina (e.v., i.pl., controle). O pré-tratamento e.v. com LP na dose de 5mg/kg apresentou redução significativa da hipernocicepção mecânica em 36% quando comparado ao grupo tratado apenas com epinefrina (i.pl.) (Figura 10).

**Figura 10: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz hipernociceção mecânica induzida por epinefrina.**



Salina (e.v., i.pl.) ou LP 5mg/kg (LP 5, e.v.) foram administrados 30 minutos antes da injeção intraplantar (i.pl.) de epinefrina (100ng/pata) e após 2 horas os animais foram desafiados no Von Frey eletrônico. Resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupos. #  $p < 0,05$  indica diferença estatística quando comparado ao grupo Salina e \*  $p < 0,05$  ao grupo epinefrina. (ANOVA, teste de Bonferroni).

#### **6.4 Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz hipernociceção persistente induzida por adjuvante completo de Freud (CFA)**

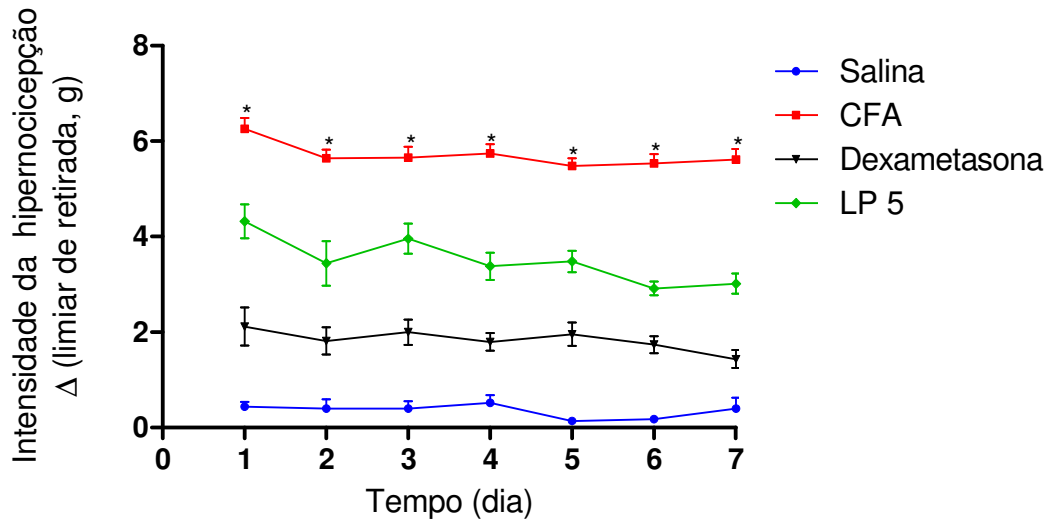
Grupo de animais tratado com CFA (20 $\mu$ L, i.pl, injetado apenas no primeiro dia de análise experimental) apresentou aumento significativo da hipernociceção mecânica durante sete dias consecutivos quando comparado ao grupo tratado com salina (i.pl., e.v.). Animais tratados com dexametasona (2mg/kg, s.c.), corticóide utilizado como droga padrão, demonstraram redução significativa da hipernociceção em 68% quando comparados àqueles tratados com CFA (i.pl.). O pré-tratamento e.v. com LP na dose de 5mg/kg apresentou importante redução da intensidade de hipernociceção em 42% quando comparado ao grupo CFA (i.pl.) (Figura 11A). As percentagens de inibição de cada grupo foram expressas como média dos sete dias de análise experimental para melhor entendimento, não havendo diferença estatística entre os dias.

a) LP reduz o edema de pata em modelo de hipernocicepção persistente induzida por CFA:

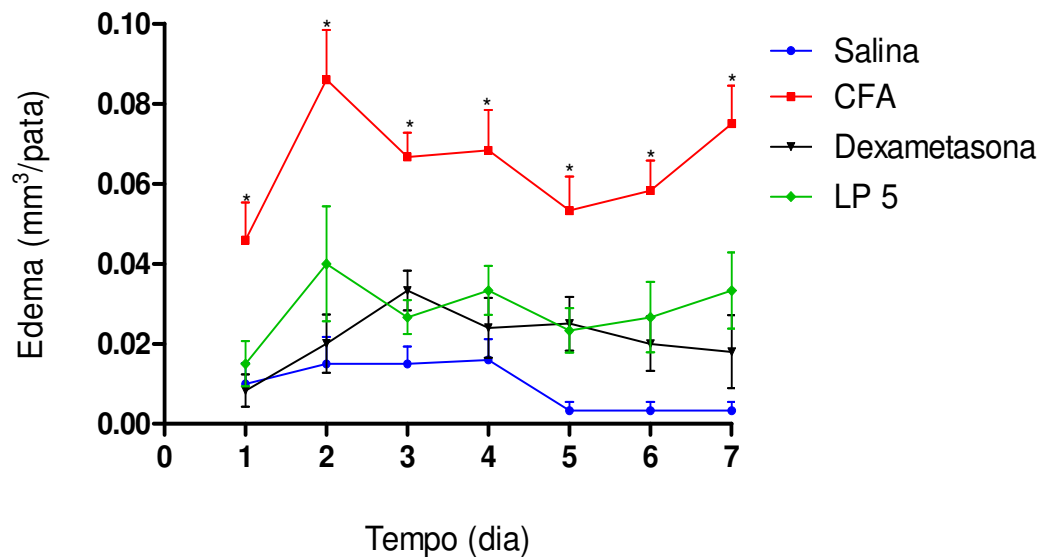
Animais que receberam injeção intraplantar de CFA (20 $\mu$ L/pata) apresentaram intenso edema ( $p < 0,05$ ) em todos os dias de análise quando comparados àqueles tratados somente com salina (e.v.). LP (5mg/kg, e.v.) e dexametasona (2mg/kg, s.c.) foram capazes de inibirem significativamente ( $p < 0,05$ ) o edema induzido por CFA em 59% e 67%, respectivamente, quando comparados ao grupo CFA (i.pl.). LP apresentou importante efeito sobre o edema de pata estimulada com CFA, não havendo diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a fração proteica e dexametasona (Figura 11B).

**Figura 11: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz a hipernociceção mecânica e edema de pata induzidos por adjuvante completo de Freud (CFA) em camundongos.**

**A)**



**B)**

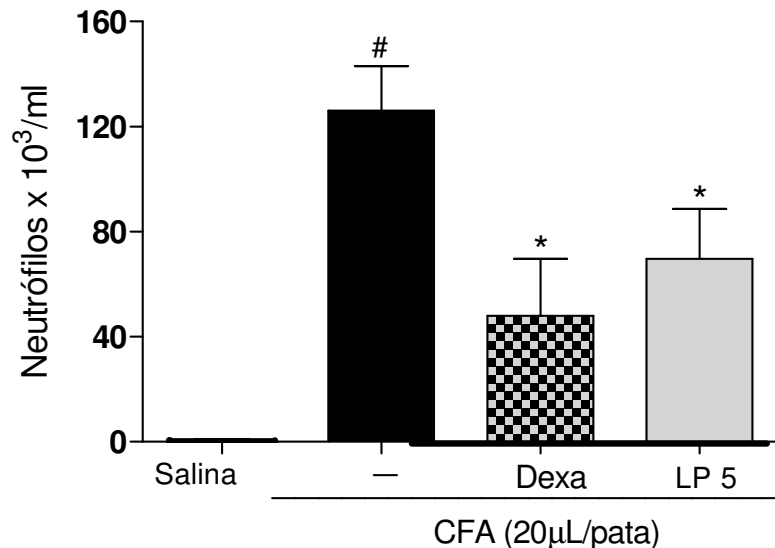


Os animais foram tratados durante sete dias consecutivos com salina (e.v.) dexametasona (2mg/kg, s.c.) e LP (5mg/kg, e.v.). Apenas no dia 1, após administração de cada droga, o CFA (20 $\mu$ L/pata) foi administrado. Resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupos. \*  $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com todos os grupos. (ANOVA, teste de Bonferroni).

b) LP reduz migração de neutrófilos induzida por CFA na pata de camundongos:

A migração de neutrófilos foi mensurada através da dosagem de MPO no tecido da pata estimulada por CFA (20 $\mu$ L/pata). A administração intraplantar deste estímulo inflamatório provocou significativo ( $p < 0,05$ ) acúmulo de neutrófilos em tecido subplantar quando comparado ao grupo tratado somente com salina (e.v., i.pl., controle). Esta atividade foi reduzida de forma significativa ( $p < 0,05$ ) nos grupos de animais pré-tratados com LP (5mg/Kg, e.v.) e dexametasona (2mg/kg, s.c.), as quais foram efetivas em reduzir intensamente o influxo de neutrófilos em 42% e 62%, respectivamente, quando comparadas ao grupo tratado com CFA (i.pl.). Na figura 12 é observado potente efeito de LP na ibição do influxo de neutrófilos causado por CFA, sendo esta atividade semelhante ao grupo dexametasona.

**Figura 12: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) reduz migração de neutrófilos induzida por adjuvante completo de Freud (CFA) na pata de camundongos.**



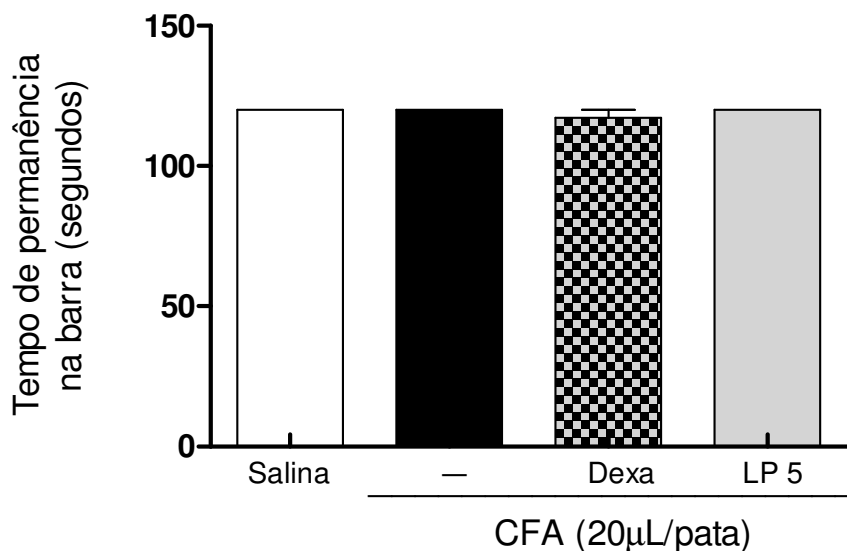
Animais foram tratados durante oito dias consecutivos com salina (controle, e.v.); dexametasona (Dexa, 2mg/kg, s.c.) e LP (LP5, 5mg/kg, e.v.). Apenas no dia 1, após administração de cada droga a, o CFA (20 $\mu$ L/pata) foi administrado. Resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupos. #  $p < 0,05$  indica diferença estatística quando comparado ao grupo Salina e \*  $p < 0,05$  ao grupo CFA. (ANOVA, teste de Bonferroni).



c) LP não interfere no desempenho motor de camundongos:

Nenhum grupo experimental modificou significativamente ( $p < 0,05$ ) o tempo de permanência dos animais sobre a barra giratória quando comparados ao grupo salina (controle, i.v. e i.pl.). Todos os camundongos tratados com salina, CFA (20 $\mu$ L/i.pl.) e LP (5mg/kg, i.v.) durante oito dias consecutivos permaneceram na barra giratória por 120 segundos (tempo máximo de análise). Já o grupo tratado com dexametasona (2mg/kg, s.c.) apresentou uma média de permanência na barra de  $117 \pm 2,8$  segundos (Figura 13).

**Figura 13: Fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP) não interfere no desempenho motor de camundongos.**



Camundongos foram tratados durante oito dias consecutivos com salina (e.v.); dexametasona (Dexa, 2mg/kg, s.c.) e LP (5mg/kg, e.v.). No oitavo dia os animais foram colocados individualmente na barra giratória e o tempo de permanência foi registrado (máximo 120 segundos). Resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais por grupos. (ANOVA, teste de Bonferroni).

## 7 DISCUSSÃO

O processo inflamatório ocorre como uma resposta do tecido à injúria celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, podendo manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, como físico (queimadura, radiação, trauma), biológico (microorganismos, reações imunológicas) ou químico (substância cáustica). Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluidos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise e reparo tecidual (BECKER, 1983). Os mediadores inflamatórios, uma vez liberados, promovem de forma sinérgica uma alteração no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo, na qual é caracterizada pela redução do limiar de percepção do estímulo doloroso aumentando a sensibilidade dos nociceptores, desta forma ocorre exagerada resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia) ou não nocivos (alodínia) (MEYER; CAMPBELL; RAJA, 1994).

A investigação científica do efeito de substâncias na hipernocicepção e nocicepção de origem inflamatória pode ser realizada seguindo vários protocolos. Dos métodos mais utilizados em laboratórios para avaliação de comportamentos apresentados por animais submetidos à experiência dolorosa (ou nociceptiva) estão aqueles que avaliam a ação de drogas sobre comportamentos indicativos de *dor manifesta* (ou nocicepção manifesta), nos quais o estímulo utilizado causa, por si só, a ativação das vias nociceptivas, induzindo o comportamento compatível com dor (teste de formalina ou de contorções abdominais com ácido acético), e os modelos de avaliação de hipernocicepção, nos quais é feita a administração de drogas que induzem a sensibilização das fibras neuronais nociceptivas. Nestes últimos, são avaliados parâmetros que indicam a presença de fenômenos como a hipernocicepção ou alodinia, ou seja, nos quais ocorre diminuição do limiar de tolerância à estimulação de caráter mecânico, térmico ou químico.

Neste estudo buscou-se a demonstração de efeito antinociceptivo de uma fração proteica isolada do látex da planta *C. procera*, que denominamos de LP. Para tanto, foi utilizado um modelo de hipernocicepção inflamatória mecânica induzida por diferentes estímulos inflamatórios em camundongos, nos quais a hipernocicepção foi avaliada através do teste de pressão crescente (Von Frey eletrônico). Este método

possibilita a determinação quantitativa da hipernocicepção inflamatória mecânica induzida tanto por estímulos inflamatórios inespecíficos (Cg e LPS) como por mediadores inflamatórios (citocinas, prostaglandinas e aminas simpáticas). Por esta razão é muito utilizado para avaliar a atividade anti-hiperalgésica de diferentes substâncias e seus mecanismos de ação.

A carragenina tem sido extensivamente utilizada para se investigar os mecanismos envolvidos em fenômenos inflamatórios agudos, como hipernocicepção, migração celular e edema bem como em modelo para se avaliar novas drogas anti-inflamatórias (VINEGAR; TRUAX; SELPH, 1976; HIGGS et al., 1980; FERREIRA et al., 1988; HARRIS et al., 2004; FERREIRA et al., 1993; CUNHA et al., 2004). Após aplicação deste agente indireto pró-inflamatório, ocorre ativação de macrófagos e aumento da migração de neutrófilos, ocorrendo a partir daí, liberação de vários mediadores inflamatórios como aminas biogênicas (histaminas, bradicinina), citocinas (TNF- $\alpha$ ; IL-6; IL-1 $\beta$ ), metabólitos do ácido aracdônico (leucotrienos, prostaglandinas) e óxido nítrico (SOUSA et al., 1988). A carragenina induz hipernocicepção mecânica dependente de duas citocinas chaves, TNF- $\alpha$  e KC. Ambas agem através da liberação de IL-1 $\beta$  que por sua vez libera prostaglandinas. Além disso, KC age também via liberação de aminas simpáticas (CUNHA et al., 2005).

No presente trabalho, o estudo do possível efeito antihipernociceptivo de LP foi iniciado avaliando o efeito desta fração na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina. Para tanto, LP foi administrada via endovenosa nas doses de 0,5; 5 e 50mg/kg sendo efetiva nas duas maiores doses, diminuindo de forma significativa a hipernocicepção da Cg no teste do Von Frey eletrônico.

O conhecimento da fisiopatologia da dor, com a identificação precisa dos mediadores inflamatórios liberados e seus mecanismos moleculares de hiperalgesia é de fundamental importância no desenvolvimento das drogas analgésicas modernas de maior seletividade e de menor toxicidade.

Um dos possíveis sítios de ação de drogas analgésicas no mecanismo fisiopatológico da dor inflamatória seria imediatamente após a instalação do processo inflamatório com a consequente migração de células e liberação dos primeiros mediadores inflamatórios representados pelas citocinas, prostaglandinas, cininas e neurocininas, responsáveis pela sensibilização dos nociceptores aferentes primários da dor (LEVINE; TAIWO, 1994).

Em geral, os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do sistema imunológico contra patógenos. Entretanto, em várias doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide, a atividade destas células pode trazer como consequência dano tecidual. A interação entre neutrófilos e células residentes (macrófagos, mastócitos, fibroblastos) no local inflamado faz com que haja aumento de liberação de citocinas e quimiocinas, além de diversas enzimas e espécies reativas de oxigênio. A partir daí ocorre o aparecimento da dor inflamatória, o principal sintoma da artrite reumatóide (KASAMA et al., 2005; PALMER; GABAY; IMHOF, 2006; CATTANI et al., 2006; TANAKA, 2006; KIM et al., 2006).

Inúmeras pesquisas demonstram que a presença e ativação de neutrófilos no foco inflamatório desempenham um papel crucial na gênese da hipernocicepção inflamatória. O neutrófilo ativado no local inflamado libera citocinas pró-inflamatórias além de prostaglandinas e aminas simpáticas que atuam diretamente na sensibilização de nociceptores (LEVINE et al., 1984; 1985; LAVICH et al., 2006; CUNHA et al., 2008a; GERRERO et al., 2008; SOUTO et al., 2011; LEMOS et al., 2009).

Em trabalho de Cunha et al. (2008a) foi demonstrado que a atividade nociceptiva das citocinas pró-inflamatórias depende do recrutamento de neutrófilos e ainda da capacidade destas células produzirem mediadores como PGE<sub>2</sub> e aminas simpáticas. Estes resultados sugerem claramente a importância de neutrófilos no estabelecimento da dor inflamatória. Isto é confirmado por outros estudos que mostram que apenas a presença de neutrófilos no foco não é suficiente para o aparecimento da hipernocicepção. Os neutrófilos precisam ser ativados. Por exemplo, o recrutamento dos neutrófilos utilizando glicogênio não causa hipernocicepção, mas quando neutrófilos foram ativados com LPS, C5a ou Cg o estado hipernociceptivo é estabelecido (CASTRO; FERREIRA 1979; LEVINE et al., 1985).

Células residentes, incluindo células dendríticas, macrófagos, linfócitos e mastócitos são componentes do tecido que, após reconhecimento do estímulo inflamatório liberam uma cascata de citocinas. As primeiras citocinas descritas como participantes no processo de dor inflamatória foram IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e as quimiocinas IL-8 (CINC-1) e KC (FERREIRA, 1988; VERRI et al., 2006; CUNHA et al., 2007).

A IL-1 $\beta$  estimula a expressão de COX2 e subsequente liberação de prostaglandinas (BERNHEIM; GILBERT; STITT, 1980; ZUCALI et al., 1986; CROFFORD et al., 1994). A hipernocicepção mecânica causada por carragenina é parcialmente (50%) atenuada quando camundongos são tratados previamente com anticorpos anti-IL-1 $\beta$ . Este resultado é compreendido, pois se sabe que a carragenina desencadeia duas importantes vias hiperalgésicas, em que uma apresenta como produto final as prostaglandinas e a outra as aminas simpáticas (CUNHA et al., 1992; FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; FERREIRA et al., 1993). A liberação da IL-1 $\beta$  está relacionada a doenças de caráter inflamatório, como a artrite reumatóide (JOOSTEN et al., 2010), a osteoartrite (PUJOL et al., 2008) e a aterosclerose (JAWIEN, 2008). TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que apresenta papel chave no desencadeamento da inflamação, imuno-modulação, angiogênese, citotoxicidade e dor (AGGARWAL; NATARAJAN, 1996; CUNHA et al., 1992).

Estas citocinas (IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) desempenham um papel crucial na manifestação de hipernocicepção inflamatória em grande número de modelos experimentais (CUNHA et al., 2005, 2008a, 2008b; VERRI et al., 2006). Há evidências de que estas moléculas podem estar atuando diretamente em neurônios nociceptivos primários promovendo a sua sensibilização (RICHTER et al., 2010; GUERRERO et al., 2012).

Outras pesquisas demonstram o importante papel de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no processo de migração neutrofílica através do aumento da expressão das moléculas de adesão na superfície endotelial, sendo estas citocinas necessárias para o correto endereçamento dos neutrófilos (HICKEY et al., 1997; KELLY; HWANG; KUBES, 2007; CANETTI et al., 2001; SAUNDERS et al., 2005). No entanto, neutrófilos ativados são essenciais para a liberação de grandes quantidades destas citocinas. Sendo este dado confirmado através do bloqueio da migração de neutrófilos por fucoidina, ferramenta farmacológica que bloqueia a interação entre selectinas do tipo E e P. A diminuição do influxo celular atenua fortemente as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no local inflamado (SACHS et al., 2011).

Considerando estes achados, o estudo foi continuado e novas estratégias experimentais delineadas com o objetivo de investigar o envolvimento da atividade antinociceptiva da LP na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina com o

recrutamento de neutrófilos e a produção de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e PGE<sub>2</sub>).

Demonstrou-se aqui que o pré-tratamento dos animais com LP diminuiu a migração de neutrófilos induzida pela administração de Cg na pata. Esta avaliação foi realizada de forma indireta através da quantificação de MPO, enzima localizada nos grânulos de neutrófilos ativados (BORREGAARD; COWLAND, 1997). A fração proteica testada reduziu de forma significativa a atividade da MPO no tecido intraplantar dos animais.

Em acréscimo, o pré-tratamento com LP também interferiu na liberação de mediadores inflamatórios na hipernocicepção inflamatória induzida por Cg, reduzindo a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e PGE<sub>2</sub> na pata dos animais.

Trabalho desenvolvido por Ramos et al. (2009) demonstrou importante atividade de subfrações (LPP1, LPP2 e LPP3) obtidas a partir da fração proteica total (LP) em modelo de microscopia intravital. Estas subfrações foram capazes de diminuir rolamento e adesão de neutrófilos em endotélio vascular mesentérico de animais tratados com carragenina. Outras proteínas de vegetais já foram sugeridas como sendo moléculas capazes de reduzir a interação entre células de defesa e endotélio e como consequência impedir a migração celular in vivo (MOTA et al., 2006; NAPIMOGA et al., 2007; NUNES et al., 2009; ALENCAR et al., 2010).

Desta forma, podemos inferir que o LP causa diminuição do influxo leucocitário provavelmente por estar interferindo na interação leucócito-endotélio através da diminuição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , uma vez que estes mediadores atuam induzindo a expressão de moléculas de adesão, aumentando a avidéz de ligação e promovendo quimiotaxia. A diminuição local da concentração destas citocinas e da quimiocina KC também está diretamente relacionada com a redução da síntese de prostaglandinas e aminas simpáticas que sensibilizam diretamente os nociceptores diminuindo o quadro doloroso causado por carragenina (CUNHA et al., 2005; CUNHA et al., 1992; LO RENZETTI et al., 2002).

O potencial terapêutico de drogas que tenham como alvo a interação leucócitos-endotélio para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas é bastante promissor. O desenvolvimento de drogas seguras e efetivas que possuam como alvo esses componentes moleculares envolvidos no rolamento e adesão dos leucócitos na resposta inflamatória pode render um novo campo, com terapias melhoradas para as desordens associadas com a inflamação (PANÉS; PERRY;

GRANGER, 1999). Assim, drogas que inibem a produção de citocinas ou atenuam diretamente a interação leucócito-endotélio, tais como corticosteróides, talidomida (RIBEIRO et al., 2000b), pentoxifilina (VALE et al., 2004), anankira (FERREIRA et al., 1988), infliximab ou produtos naturais (MIZOKAMI et al., 2011; TOBIN; KIRBY, 2005; GRESPAN et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2010) são importantes ferramentas anti-inflamatórias e consequentemente analgésicas.

Os fármacos de ação periférica podem ser classificados em dois tipos: fármacos que previnem a sensibilização dos nociceptores (inibidores da síntese de mediadores hiperalgésicos finais, antagonistas de receptores dos mediadores finais e bloqueadores da liberação ou a ação de citocinas) e os fármacos capazes de reverter a sensibilização dos nociceptores já estabelecida. Entre essas drogas, podemos destacar os opióides de ação periférica e alguns AINEs, como a dipirona e diclofenaco (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004; CUNHA et al., 2010; TONOSI; FERREIRA, 1993).

O conjunto de resultados obtidos até esta etapa do estudo mostra que a administração de LP promove uma ação anti-hiperalgésica indireta prevenindo a sensibilização dos nociceptores via inibição da síntese de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e PGE<sub>2</sub>.

Cunha et al. (2005) demonstraram que a hipernocicepção inflamatória mecânica induzida por Cg depende de duas citocinas chaves, TNF- $\alpha$  e KC, as quais agem através da liberação de IL-1 $\beta$  que por sua vez libera prostaglandinas. Entretanto, estes autores demonstraram que diferentemente da IL-1 $\beta$ , KC tem sua ação independente da liberação de prostaglandinas, mas é dependente da liberação de aminas simpáticas.

Desta forma, os resultados deste estudo sinalizam para elaboração de algumas hipóteses em relação ao efeito de LP na cascata de citocinas envolvidas da hiperalgesia inflamatória: LP estaria reduzindo a liberação de TNF- $\alpha$ , que por sua vez reduz a liberação de IL-1 $\beta$  e consequentemente reduz a síntese de prostaglandinas; a redução da liberação de KC por LP contribui também para a diminuição da liberação de IL-1 $\beta$  e aminas simpáticas.

As prostaglandinas são consideradas mediadores finais da dor inflamatória, visto que podem ativar diretamente os nociceptores, ou seja, independem da liberação de outros mediadores, promovendo a sensibilização destes receptores para uma dada estimulação posterior, não causando dor espontânea (FERREIRA et al., 2009). De uma forma geral, a PGE<sub>2</sub> pode aumentar a permeabilidade vascular,

promover vasodilatação além de diminuir o limiar de disparos de potenciais de ação, facilitando a excitação neuronal, levando à hiperalgesia (CALDER, 2009; FERREIRA et al., 2009). Inúmeros estudos experimentais demonstram que em um quadro inflamatório, além das prostaglandinas, as aminas simpáticas (Ex: noradrenalina, epinefrina e dopamina) são capazes de induzir hipernocicepção mecânica (NAKAMURA; FERREIRA, 1987; KHASAR et al., 1999).

Estes mediadores atuam através de receptores acoplados a proteína G, preferencialmente presentes na membrana neuronal de fibras C ou nociceptores “dormentes” levam a ativação de vias de segundos mensageiros intracelulares. Estas vias intracelulares iniciam com a produção de AMPcíclico e consequente ativação das proteínas quinases A e C, as quais catalisam reações de fosforilação de canais de sódio tetrodotoxina resistente NaV 1.8. alterando sua condutância o que aumenta a excitabilidade neuronal (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; ENGLAND; BEVAN; DOCHERTY, 1996; GOLD et al., 1996; GOLD et al., 1998; KHASAR et al., 1998; AKOPIAN et al., 1999; KHASAR et al., 1999).

Desta forma, a próxima estratégia experimental foi elaborada no sentido de investigar se LP é capaz de bloquear diretamente a sensibilização do nociceptor. Para tanto, o efeito de LP foi avaliado na hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> e por epinefrina. Nestas abordagens a LP foi capaz de reduzir a hipernocicepção induzida tanto pela PGE<sub>2</sub> quanto pela epinefrina. Estes resultados sinalizam fortemente que LP possa estar diminuindo a hiperalgesia inflamatória atuando de forma indireta prevenindo a sensibilização dos nociceptores e também de forma direta, bloqueando o curso da sensibilização e ativação dos nociceptores.

O óxido nítrico é um dos poucos gases cuja molécula tem função sinalizadora conhecida, desempenhando um papel em uma variedade de processos biológicos. NO está envolvido em vários níveis da via de sinalização nociceptiva; entretanto, o papel do óxido nítrico se modifica de acordo com o tipo de estímulo doloroso e do local (sistema nervoso periférico e central). A inibição do óxido nítrico pode ter efeitos antinociceptivos em modelos animais de hiperalgesia térmica ou de dor visceral, no entanto, a inibição da síntese de óxido nítrico exacerba a dor em modelos de hiperalgesia mecânica. O exato mecanismo pró-inflamatório ou antiinflamatório do óxido nítrico nestes modelos não está, ainda totalmente claro (MARTIN et al., 2006). Em locais de inflamação, os efeitos da produção de óxido nítrico variam de acordo com o tipo de célula produtora de óxido nítrico, o tipo de NO



sintase envolvida, e a quantidade de óxido nítrico liberado. Pequenas quantidades de óxido nítrico protegem o tecido por inibir a proliferação de células T, limitando a adesão e migração de neutrófilos, mantendo a perfusão tecidual via vasodilatação, efeitos antiplaquetários, além do efeito antinociceptivo direto nos nociceptores (KOSHLAND, 1992).

Na hipernocicepção inflamatória, o NO ativa a enzima guanilato ciclase, que por sua vez, aumenta os níveis de GMPcíclico em muitos tipos de células. Este segundo mensageiro ativa proteína quinase G (PKG) que atuam promovendo a abertura dos canais de potássio ATP dependentes ( $K^+_{ATP}$ ), induzindo uma hiperpolarização da fibra nervosa o que a torna menos sensível favorecendo a analgesia (ZHANG et al., 2011).

Investigando esta via nociceptiva periférica, NO/GMPc/ $K^+_{ATP}$ , inúmeros estudos demonstram sua íntima relação com mecanismos de ação de vários analgésicos como dipirona, ceterolaco, indometacina, morfina e alguns produtos naturais (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004; VENTURA-MATINEZ et al., 2004; ALVES; DUARTE, 2002; MIZOKAMI et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2010; TÉLESPHORE et al., 2010). Outros estudos demonstram que a isoforma constitutiva nNOS está diretamente envolvida com os efeitos analgésicos de substâncias que ativam esta via NO-GMPc (CUNHA et al., 2010; OHGAMI et al., 2009; GUTIERREZ et al., 2012).

Para elucidar possível mecanismo pelo qual a LP diminui a hiperalgesia causada por  $PGE_2$ , foram feitos experimentos que analisaram a participação de NO e de canais de  $K^+_{ATP}$ . A administração de L-NAME (inibidor inespecíficos da NOS) e glibenclamida (bloqueador dos canais de  $K^+_{ATP}$ ) 30 minutos antes de LP (5mg/kg) reverteram o efeito antihipernociceptivo de LP em modelo de hipernocicepção mecânica induzida por  $PGE_2$ . Estes resultados sugerem que o efeito de LP neste modelo pode estar intimamente relacionado com ativação da via NO/GMPc/ $K^+_{ATP}$ , mecanismo este semelhante aos dos analgésicos padrões citados acima.

A dor crônica tem se caracterizado em um grande desafio à medicina e à psicologia devido as dificuldades e limitações dos tratamentos existentes. Sendo assim, seu tratamento apresenta numerosos desafios (ZWEIFLER, 2012). De fato, as drogas disponíveis até o momento, com o intuito de aliviar as dores crônicas, são efetivas somente em uma pequena parcela dos pacientes.

Portanto, em busca de avaliar um possível efeito do LP sobre dor crônica o efeito desta fração foi analisado em um modelo de hipernocicepção inflamatória persistente induzida pela administração de adjuvante completo de Freud (CFA).

A administração local de CFA causa extravasamento plasmático, infiltração de células inflamatórias com aumento nos níveis de diversos mediadores inflamatórios, tais como citocinas, neutrofinas, eicosanoides, histamina, serotonina (BURSTEIN et al., 2004; RAGHAVENDRA; DELEO; HERTZ, 2003). O Fator de Crescimento Neuronal (NGF) é uma neutrofina especialmente relacionada à sensibilização neuronal. Ele é capaz de aumentar a expressão de diversos nociceptores envolvidos na dor, como aqueles ativados por bradicinina (B1 e B2), importantes tanto na manutenção da hiperalgesia inflamatória persistente quanto na amplificação da formação do edema. Os mecanismos pelos quais o CFA desenvolve a dor crônica estão relacionados com o aumento da expressão de canais de sódio e potássio, responsáveis pela excitabilidade neuronal, além do aumento de citocinas a nível periférico e central (MENDELL; BASBAUM; BUSHNELL, 2009; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001).

Demonstrou-se aqui que a LP administrada diariamente diminuiu a hipernocicepção persistente e edema de pata induzidos pela administração (i.pl) CFA. Estes resultados estão intimamente relacionados com a diminuição da migração de neutrófilos para a pata estimulada com CFA.

Estes resultados corroboram com estudo anterior que demonstra atividade da LP em diminuir o edema causado por carragenina e não por dextrana (ALENCAR et al., 2004). Sabe-se que edema causado por carragenina está associado à produção de diferentes mediadores inflamatórios, incluindo histamina, serotonina, prostaglandina, NO e até migração de leucócitos (SRINIVASAN et al., 2001). Enquanto que dextrana é um agente inflamatório conhecido por provocar a liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina), por degranulação mastocitária, causando assim um edema osmótico, acelular caracterizado por aumento de permeabilidade vascular e extravasamento de fluido (PARRAT et al., 1958; LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982).

Mediadores envolvidos na gênese da dor inflamatória também apresentam papel essencial no desencadeamento de outros eventos inflamatórios como a formação de edema. As prostaglandinas podem ter papel crucial na formação do edema (WILLIAMS; MORLEY, 1973; ZANONI et al., 2012; LEGLER et al., 2011).

Corroborando com os resultados observados no modelo de hipernocicepção induzida por Cg no qual o efeito antihipernociceptivo de LP está relacionado com a redução de PGE2 e citocinas pró-inflamatórias, provavelmente estes mediadores podem estar envolvidos com a diminuição da hiperalgesia e edema causados por CFA.

Como no protocolo de avaliação de dor crônica os animais foram tratados durante oito dias com LP, sentimos a necessidade de avaliar possível interferência destas proteínas sobre a capacidade de locomoção dos animais, já que um impedimento locomotor relacionado à administração de algumas substâncias reflete um estado de imobilidade prolongada podendo, desta forma, interferir na avaliação comportamental do animal frente ao estímulo experimental (Von Frey eletrônico). Para este fim, foi feito o teste do rota rod. O LP, na dose de 5mg/kg, não apresentou nenhuma interferência sobre o sistema locomotor dos camundongos. Com este resultado podemos afirmar que os comportamentos nociceptivos (flinche) observados em nossos experimentos não sofreram interferências locomotoras. Outra possibilidade que nos foi cogitada, devido ao tratamento durante oito dias, foi a possíveis efeitos tóxicos agudos da LP. No entanto, Oliveira et al. (2007, 2010) demonstraram que frações de LP não apresentam eventos toxicológicos agudos em camundongos e ratos, respectivamente.

Finalmente, o conjunto de resultados produzidos neste estudo, apesar de pré-liminares, são consistentes e credenciam a fração proteica do látex de *C. procera*, como uma possível ferramenta a ser estudada na prevenção e/ou controle da dor inflamatória.

Apesar da existência de muitos alvos relevantes para o estudo do possível mecanismo anti-nociceptivo de LP, inclusive um possível efeito central, neste trabalho nossos estudos foram direcionados para investigação do envolvimento desta fração com a liberação de mediadores inflamatórios, migração de neutrófilos e canais de potássio dependentes de ATP. Entretanto, novas abordagens devem ser realizadas no sentido de melhor esclarecer o mecanismo de ação do efeito inibitório de LP na dor inflamatória, através do estudo de vias metabólicas de sinalização intracelular, receptores, canais iônicos entre outros.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados produzidos neste estudo demonstram efeito antihipernociceptivo de uma fração proteica isolada do látex da planta *Calotropis procera* (LP) na hiperalgisia inflamatória aguda e persistente. O efeito de LP parece envolver diferentes mecanismos:

- 1) LP previne a sensibilização dos nociceptores ao inibir a liberação de mediador hiperalgésico final ( $\text{PGE}_2$ ) e diminuir a liberação de citocinas ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e KC) com possível envolvimento de neutrófilos;
- 2) LP possivelmente bloqueia diretamente a sensibilização do nociceptor, ao inibir a hipernocicepção induzida por  $\text{PGE}_2$  e epinefrina, com envolvimento da via L-arginina/ $\text{NO}/\text{K}^+_{\text{ATP}}$ .

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B.B.; NATARAJAN, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur. Cytokine Netw.**, v.7, p.93-124, 1996.
- AGRAWAL, A.A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v.40, p. 311-331, 2009.
- ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, J.S.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; VALE, M.R.; ETHELLENS, J.P.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS, M.V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm. Res.**, v. 55, p. 559-564, 2006.
- ALENCAR, N.M.N.; FIGUEREDO, I. S. T.; VALE, M.R.; BITENCURT, F.S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A; RAMOS, M. V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in: Three different experimental models: Peritonitis, Paw edema and Hemorrhagic cystitis. **Plant. Med.**, v.7, p.1144-1149, 2004.
- ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, R.S.B.; FIGUEIREDO, J.G.; CAVALCANTE, I.J.M.; MATOS, M.P.V.; CUNHA, F.Q.; NUNES, J.V.S.; BONFIM, L.R.; RAMOS, M. V. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE<sub>2</sub> action in acute inflammation models. **Inflamm. Res.**, v.59, p.245–254, 2010.
- ALVES, D.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 444, n. 1/2, p. 47-52, 2002.
- ARCHER, B.L.; AUDLEY, B.G.; MCWEENEY, G.P.; HONG, T.C.J. Studies on composition of latex serum and “bottom fraction” particles. **J. Rub. Res. Inst. Malaysia**, v. 21, p. 560-569, 1969.
- BARON, R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. **Clin. J. Pain**, v.16, p.12-20, 2000.
- BARRET, A.J.; BUTTLE, D.J. Names and numbers of papaya proteinases. **Biochem.**, v.228, p.527, 1985.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, p.267-284, 2009.
- BASBAUM, A.; JESSELL, T. The perception of pain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Principles of neural science**. 4th ed. New York: MacGraw-Hill, 2000. p. 472-491.
- BASU, A.; CHAUDHURI, A.K. Preliminary studies on the anti-inflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract. **J. Ethnopharmacol.**, v.31, p.319-324, 1991.

BEKER, E.L. Chemotactic factors of inflammation. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 4, n. 5, p. 223-225, 1983.

BENNETT, G.; AL-RASHED, S.; HOULT, J. R.; BRAIN, S. D. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. **Pain**, v.77, p.315–322, 1998.

BERNHEIM, H.A.; GILBERT, T.M.; STITT, J.T. Prostaglandin E levels in third ventricular cerebrospinal fluid of rabbits during fever and changes in body temperature. **J. Physiol.**, v.301, p.69–78, 1980.

BISGAARD, H.; KRISTENSEN, J.K. Leukotriene B4 produces hyperalgesia in humans. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 791-797, 1985.

BLACKWELL, T.S.; CHRISTMAN, J.W. Sepsis and cytokines: current status. **Br. J. Anaesth.**, v.77, p.110-117, 1996.

BOMBINI, G.; CANETTI, C.; ROCHA, F. A.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v.496, p.197–204, 2004.

BONICA, J.J. Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. In: BONICA, J. J. **Management of Pain**. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, p. 3503-3521, 1997.

BROCKBANK, W.J.; LYNN, K.R. Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed). **Biochim. Biophys. Acta**, v.578, p.13-22, 1979.

BURSTEIN, S.H.; KARST, M.; SCNEIDER, U.; ZURIER, R.B. Ajulenin acid: a novel cannabinoid produces analgesia without a "high". **Life Sci.**, v.75, p.1513-1522, 2004.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. **Biochimie**, v.91, p.791-795, 2009.

CANETTI, C.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor- $\alpha$  and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, p. 1619-1628, 2001.

CASTRO, M.S.A.; FERREIRA, S.H. Cell migration and hyperalgesia: a paradoxical effect of endotoxin. **Adv. Inflamm. Res**, v.1, p.311–316, 1979.

CATTANI, F.; GALLESE, A.; MOSCA, M.; BUANNE, P.; BIORDI, L.; FRANCAVILLA, S.; COLETTI, G.; PELLEGRINI, L.; MELILLO, G.; BERTINI, R. The role of CXCR2 activity in the contact hypersensitivity response in mice. **Eur. Cytokine Netw.**, v.17, p.42–48, 2006.

CHEYE, M.L.; CHEUNG, K.Y. Beta-1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Plant. Mol. Biol.**, v.29, p.397-402, 1995.

CONTI, B.; TABAREAN, I.; ANDREI, C.; BARTFAI, T. Cytokines and fever. **Front. Biosci.**, v.9, p.1433-1449, 2004.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R.M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v.429, p. 161–176, 2001.

CROFFORD, L.J.; WILDER, R.L.; RISTIMAKI, A.P.; SANO, H.; REMMERS, E.F.; EPPS, H.R. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. **J. Clin. Invest.**, v.93, p.1095–1101, 1994.

CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Cytokine mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, p. 1418–1424, 2000.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; FUKADA, S. Y.; GERRERO, A. T. G.; SANTODOMINGO-GARZÓN, T.; POOLE, S.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F.Q. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1i but not B2 kinin receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 573, p. 221-229, 2007.

CUNHA, T.M.; VERRI Jr, W.A.; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F.; REIS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.

CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.521, p.22-39, 2005.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A.J.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.102, p.1755-1760, 2005.

CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 521, p. 22-39, 2003.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.107, p.660-664, 1992.

CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v.104, p.765-767, 1991.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; FUKADA, S. Y.; GERRERO, A. T. G.; SANTODOMINGO-GARZÓN, T.; POOLE, S.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F.Q. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1i but not B2 kinin receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 573, p. 221-229, 2007.

CUNHA, T.M.; VERRI JUNIOR, W.A.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

CUNHA, T.M.; VERRI JUNIOR, W.A.; SCHIVO, I.R.S.; NAPIMOGA, M.H.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J. Leukocyte Biol.**, v. 83, p. 824-832, 2008.

CUNHA, T.M.; BARSANTE, M.M.; GUERRERO, A.T.; VERRI Jr, W.A.; FERREIRA, S.H.; COELHO, F.M.; BERTINI, R.; GIACINTO, C.D.; ALLEGRETTI, M.; CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v.154, p.460-470, 2008b.

CUNHA, T. M.; BARSANTE, M. M.; GUERRERO, A. T.; VERRI JR, W. A.; FERREIRA, S. H.; COELHO, F. M.; BERTINI, R.; DI GIACINTO, C.; ALLEGRETTI, M.; CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. **Br J. Pharmacol.**, v.154, p. 460–470, 2008c.

DE MELO, J.D.; TONUSSI, C.R.; D'ORLÉANS-JUSTE, P.; ERA, G.A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints of the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. **Pain**, v. 77, p. 261–270, 1998.

DELTA UNIVERSAL. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Delta, 1982.

DIEYE, A.M.; TIDJANI, M.A.; DIOUF, A.; BASSENE, E.; FAYE, B. Senegalese pharmacopoeia: study of acute toxicity and antitussive activity of *Calotropis procera* AIT (Asclepiadaceae). **Dakar Med.**, v.38, p.69–72, 1993.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M.F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med.**, v.74, p.699-711, 2008.

DOURSOUT, M.F.; LIANG, Y.; CHELLY, J.E. NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. **Can. J. Anaesth.**, v. 50, p. 909-916, 2003.

DRAY, A.; BEVAN, S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *Trends Pharmacol.* **Science**, v.14, p.287-290, 1993.



- DUARTE, I.D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, p. 341-343, 1988.
- DUBOIS, T.; JACQUET, A.; SCHNEK, A.G.; LOOZE Y. The thiol proteinases from the latex of carica papaya. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v.369, p.733-740, 1988.
- ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P.V. A Revised Classification of Apocynaceae s.l. **Bot. Rev.**, v.66, p.1-56, 2000.
- ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J. Physiol.**, v.495, p.429-440, 1996.
- FARQUHAR-SMITH, W. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesth. Int. Care Med.**, v.9, p.3-7, 2007.
- FERREIRA, S.H. The Role of Interleukins and Nitric Oxide in the Mediation of Inflammatory Pain and its Control by Peripheral Analgesics. **Drugs**, v.46, p.1-9, 1993.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.110, p.1227-1231, 1993.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S. Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **Agents Actions**, v.38, p.7-9, 1993.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v.334, p.698-700, 1988.
- FERREIRA, S.H.; ROMITELLI, M.; De NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 13, n. 5, p. 220-222, 1989.
- FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. **Prostaglandins**, v.18, p.179-190, 1979.
- FERREIRA, S.H.; FERRARI, L.F.; CUNHA, T.M.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; VERRI JUNIOR, W.A.; CUNHA, F.Q. Dor inflamatória. In: ALVES-NETO, O.; COSTA, C.M.C.; DE SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. **Dor: princípios práticos**. Porto Alegre: Artmed, 2009. cap.19, p.265-279.
- FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; CUNHA, T.M., LUZ, P.B.; NASCIMENTO, K.S.; MOTA, M.R.L. Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.96, p.371-377, 2010.

- FILEP, J.G.; FOURNIER, A. FOLDES-FILEP, E. Acute pro-inflammatory actions of endothelin-1 in the guinea-pig lung: involvement of ETA and ETB receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, n. 2, p. 227-236, 1995.
- FIORILLO, F.; PALOCCI, C.; SIMONETTA, S.; PASQUA, G. Latex lipase of *Euphorbia characias* L.: an aspecific acylhydrolase with several isoforms. **Plant. Sci.**, v.172, p.722–727, 2007.
- FLOWER, J.R. The development of COX 2 inhibitors. **Nat. Drug Discov. Rev.**, v.2, p.179-181, 2003.
- FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRUNET, G.; SAVARD, P.; CHARLESON, S. Leukotriene B<sub>4</sub>, polymorphonuclear leukocytes and inflammatory exudates in the rat. **Prostaglandins**, v.28, p.13–27, 1984.
- FOSTER, P.A.; COSTA, S.K.; POSTON, R.; HOULT, J.R.; BRAIN, S.D. Endothelial cells play an essential role in the thermal hyperalgesia induced by nerve growth factor. **Faseb J.**, v.17, p.1703–1705, 2003.
- FREITAS, A.P.F.; BITENCOURT, F.S.; BRITO, G.A.C.; ALENCAR, N.M.N.; RIBEIRO, R.A.; LIMA-JUNIOR, R.C.P; RAMOS, M.V.; VALE, M.L. Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 385, n. 10, p. 981-990, Oct. 2012.
- FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, F.C.S.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; DOMONT, G.B.; RAMOS, M.V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiol. Biochem.**, v.49, p.738-743, 2011.
- FREITAS, C.D.T.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M.R.A.; MACEDO N.M.R.; SALES M. P.; VILLAS-BOAS L. A.; RAMOS M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.45, p.781-789, 2007.
- FU, J.Y.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.16737-16740, 1990.
- FUCHS, F.D.; WANNAMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v.48, p.129-141, 1999.
- GALLEGOS-OLEA, R.S.; OLIVEIRA, A.V.; SILVEIRA, L.M.S.; SILVEIRA, E.R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia**, v.73, p.263-265, 2002.
- GIORDANI, R.; LAFON, L. Action of *Carica papaya* latex on cell wall glycosidases from *Lactuca sativa*. **Phytochemistry**, v.34, p.1473-1475, 1993.

GRESPLAN, R.; LEMOS, H.P.; CARREGARO, V.; VERRI, W.A.Jr.; SOUTO, F.O.; OLIVEIRA, C.J.F.; TEIXEIRA, C.; RIBEIRO, J.M.; VALENZUELA, J.G.; CUNHA, F.Q. The protein LJM111 from *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Extract (SGE) accounts for the SGE-inhibitory effects upon inflammatory parameters in experimental arthritis model. **Int. Immunopharmacol.**, v.12, p.603-610, 2012.

GUERRERO, A.T.; CUNHA, T.M; VERRI JR, W.A.; GAZZINELLI, R.T.; TEIXEIRA, M.M.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 674, p.51-57, 2011.

GUTIERREZ, V; ZAMBELLI, V; PICOLO, G.; CHACUR, M.; SAMPAIO, S.; BRIGATTE, P.; CURY, Y. Peripheral L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels are involved in the antinociceptive effect of crotafline on neuropathic pain in rats. **Behav. Pharmacol.**, v. 23, n. 1, p. 14-24, 2012.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HAGEL, J.M.; YEUNG, E.C.; FACCHINI, P.J. Got milk? the secret life of laticifers. **Trends in Plant Sci.**, v.13, p.631-639, 2008.

HANDWERKER, H.O. Influences of algogenic substances and prostaglandins on the discharges of unmyelinated cutaneous nerve fibers identified as nociceptors. In: BONICA, J. J.; ALBE-FESSARD, D. (Ed.). **Advances in Pain Research and Therapy**. New York: Raven Press, 1976. v.1, p.41-45.

HARRIS, R.R.; BLACK, L.; SURAPANENI, S.; KOLASA, T.; MAJEST, S.; NAMOVIC, M.T. ABT-963 [2-(3,4-difluoro-phenyl)-4-(3-hydroxy-3-methyl-butoxy)-5-(4-methanesulfonyl-phenyl)-2H-pyridazin-3-one], a highly potent and selective disubstituted pyridazinone cyclooxygenase-2 inhibitor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.311, p.904-912, 2004.

HICKEY, M.J.; REINHARDT, P.H.; OSTROVSKY, L.; JONES, W.M.; JUTILA, M.A.; PAYNE, D. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces leukocyte recruitment by different mechanisms in vivo and in vitro. **J. Immunol.**, v.158, p.3391-3400, 1997.

HIGGS, G.A.; EAKINS, K.E.; MUGRIDGE, K.G.; MONCADA, S.; VANE, J.R. The effects of non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenin-induced inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v.66, p.81-86, 1980.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase 2-10 years later. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.300, p.367-365, 2002.

HOPKINS, S.J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg. Med.**, v.5, p.S45-57, 2003.

HUME, D.A.; FAIRLIE, D.P. Therapeutic targets in inflammatory disease. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n. 25, p. 2925-9, 2005.

HUNT, S.P.; MANTYH, P. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.2, p.83-91, 2001.

HUSSEIN, H.T.; KAMEL, A.; ABOUT-ZEID, M.; EL-SEBAE, A.K.H.; SALEH, M. A. Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snail. **J. Chem. Ecol.**, v.20, p.135-140, 1994.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; JABBAR, A.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M.N. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. **J. Ethnopharmacol.**, v.102, p.256-261, 2005.

ISSEKUTZ, A. C. Role of polymorphonuclear leukocytes in the vascular responses of acute inflammation. **Lab. Invest.**, v.50, p.605–607, 1984.

JAWIEN, J. New insights into immunological aspects of atherosclerosis. **Pol. Arch. Med. Wewn.**, v. 118, n. 3, p.127-131, 2008.

JOOSTEN, L.A.; EA, H.K.; NETEA, M.G. BUSSO, N. Interleukin-1 $\beta$  activation during acute joint inflammation: a limited role for the NLRP3 inflammasome in vivo. **Joint Bone Spine**, v. 78, p. 107-110, 2010.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p.203-210, 2001.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v.4, p.273–279, 2005.

KEKWICK, R.G.O. Latex and Laticifers. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-6, 2001.

KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.120, p.3–10, 2007.

KHASAR, S.G.; LIN, Y.H.; MARTIN, A.; DADGAR, J.; MCMAHON, T.; WANG, D. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron**, v.24, p.253-260, 1999.

KHASAR, S.G.; MIAO, J.P.; JANIG, W.; LEVINE, J.D. Modulation of bradykinin-induced mechanical hyperalgesia in the rat by activity in abdominal vagal afferents. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, p. 435-444, 1998.

KIM, N.D.; CHOU, R.C.; SEUNG, E.; TAGER, A.M.; LUSTER, A.D.A. Unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. **J. Exp. Med.**, v.203, p.829–835, 2006.

KIRTIKAR, K.R.; BASU, B.D. **Indian medicinal plants**. Allahabad: Lolit Mohan Basu, 1935.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: editora BASF, 1999.

KITAJIMA, S.; KAMEI, K.; TAKETANI, S.; YAMAGUCHI, M.; KAWAI, F.; KOMATSU, A.; INUKAI, Y. Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity. **BMC Biochem.**, v.11, p.6, 2010.

KLEMM, P.; WARNER, T.D.; HOHLFELD, T.; CORDER, R.; VANE, J.R. Endothelin-1 mediates ex vivo coronary vasoconstriction caused by exogenous cytokine. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 2691–2695, 1995.

KOSHLAND DE JR. The molecule of the year. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1861, 1992.

KUMAR, V.L.; CHAUDHARY, P.; RAMOS, M.V.; MOHAN, M.; MATOS, M.P. Protective Effect of proteins derived from the latex *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthritic rats. **Phytother. Res.**, v.25, p.1336-1341, 2011.

KUMAR, V.L.; PADHY, B.M. Protective effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* against oxidative stress and renal damage in diabetic rats. **Biocell**, v.35, p.63-69, 2011.

KUMAR, V.L.; SEHGAL, R. *Calotropis procera* latex-induced inflammatory hyperalgesia - effect of bradyzide and morphine. **Auton. Autacoid. Pharmacol.**, v.27, p.143-149, 2007.

KUMAR, V.L.; ROY, S. *Calotropis procera* latex extract affords protection against inflammation and oxidative stress in Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in rats. **Mediators Inflamm.**, v.2007, p.1-7, 2007.

KUMAR, V. L.; SHIVCAR, Y.M. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Mediators Inflamm.**, v.13, p.151-155, 2004.

LARHSINI, M.; MARKOUK, M.; JAOUHARI, J.T.; BEKKOUCH, K.; LAZREK, H.B.; JANA, M. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytother. Res.**, v.16, p.97-98, 2002.

LARHSINI, M.; MARKOUK, M.; JAOUHARI, J. T.; BEKKOUCHE, K.; LAZREK, KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v.76, p.115-118, 2001.

LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H.B.; JANA, M.; AMAROUCHE, H. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v.4, p.371-373, 1997.

LAVICH, T.R.; SIQUEIRA, R.A.; FARIAS-FILHO, F.A.; CORDEIRO, R.S.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A. Neutrophil infiltration is implicated in the sustained thermal hyperalgesic response evoked by allergen provocation in actively sensitized rats. **Pain**, v.125, p.180–187, 2006.

LEGLER, D.F.; BRUCKNER, M.; UETZ-VON, A.E.; KRAUSE, P. Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.42, n. 2, p.198–201, 2010.

LEMOS, H.P.; GRESPAN, R.; VIEIRA, S.M.; CUNHA, T.M.; VERRI, W.A.Jr; FERNANDES, K.S.S. Prostaglandin mediate IL-23/IL-17-induced neutrophils migration in inflammation by inhibiting IL-12 INF-gama production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.106, p.5954-5959, 2009.

LEVINE, J.D.; TAIWO, Y; WALL, P.D.; MELZACK, R. Inflammatory Pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R.; BONICA, J. J. **Textbook of pain**. 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.

LEVINE, J.D.; GOODING, J.; DONATONI, P.; BORDEN, L.; GOETZL, E.J. The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. **J. Neurosci.**, v.5, p.3025–3029, 1985.

LEVINE, J.D.; LAU, W.; KWIAT, G.; GOETZL, E.J. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, v.225, p.743–745, 1984.

LEVY, J. H. The human inflammatory response. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 27, p. 31-37, 1996.

LIMA-FILHO, J.V.M.; PATRIOTA, J.M.; SILVA, A.F.; FILHO, N.T.; OLIVEIRA, R.S.B.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enteric serovar Typhimurium*. **J. Ethnopharmacol.**, v.129, p.327-334, 2010.

LO, T.N.; ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenin evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.221, p.261-267, 1982.

LOESER. J.D.; MELZACK, R. Pain: na onerview. **Lancet**, v. 353, p.1607-1609, 1999.

LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur. Cytokine Netw.**, v.13, p.456-461, 2002.

LORENZI, H; MATOS, F.J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Planatarum, 2002.

LUKKARINEN, H.; LAINE, J.; AHO, H.; ASIKAINEN, E.; PENTTINEN, P.; KAAPA, P. Inhibition of COX-2 aggravates neutrophil migration and pneumocyte apoptosis in surfactant-depleted rat lungs. **Pediatr. Res.**, v.59, p.412–417, 2006.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v.26, p.939-944, 1987a.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Acid phosphatases from latices of Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v.26, p.655-657, 1987b.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v.25, p.2279–2282, 1986a.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. Lectins from latices of *Euphorbia* and *Elaeophorbium* species. **Phytochemistry**, v. 25, p.1553–1557, 1986b.

MACMAHON, B. MITCHEL, S.; BRADY, H.R.; GODSON, C. Lipoxins: revelations on resolutions. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.22, p.391-395, 2001.

MAGALHÃES, H.F.; FERREIRA, P.M.; MOURA, E.S.; TORRES, M.R.; ALVES, A.P.; PESSOA, O.D.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. *in vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.82, p.407-416, 2010.

MARCHAND, S. The physiology of pain mechanism: from the peripheral to the brain. **Rheum. Dis. Clin. N. Am.**, v.34, p.285-309, 2008.

MARTIN, E. et al. Nitric oxide cell signaling mediated by cGMP. In: GROUP, T. F. (Ed.). **Nitric oxide, cell signaling, and gene expression**. Los Angeles: CRC Press, 2006. p. 188. (Oxidative Stress and Disease).

MASCOLO, N.; SHARMA, R.; JAIN, S.C.; CAPASSO, F. Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. **J. Ethnopharmacol.**, v.22, p.211-221, 1988.

MATHUR, R.; GUPTA, S.K.; MATHUR, S.R.; VELPADIAN, T. Anti-tumor studies with extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. root employing Hep2 cells and their possible mechanism of action. **Indian J. Exp. Biol.**, v.47, p.343-348, 2009.

MENDELL, L.M.; BASBAUM, A.I.; BUSHNELL, C. Neutrophins and pain. In: BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, C. (Ed.). **Science of pain**. Oxford: Elsevier, 2009. cap. 22, p.259-278.

MENEZES, R. A. Neuroanatomofisiologia da Dor. In: MENEZES, R. A. (Org.). **Síndromes Dolorosas: diagnóstico-terapêutico – saúde física e mental**. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. p.9-19.

MEYR, A.J.; STEINBERG, J.S. The Physiology of the Acute Pain Pathway. **Clin. Podiatr. Med. Surg.**, v.25, p. 305-326, 2008.

MEYER, A.J; SAFFRAN, B. The pathophysiology of the chronic pain cycle. **Clin Podiatr. Med. Surg.**,v. 25, p. 327-346, 2008.

MEYER, R.A.; CAMPBELL, F.N.; RAJA, S.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p.13-44.

MITCHEL, R.E.J.; CHAIKEN, I.M.; SMITH, E.L. The complete amino acid sequence of papain. **J. Biol. Chem.**, v.245, p.3485-3492, 1970.

MIZOKAMI, S.S.; ARAKAWA, N.S.; AMBROSIO, S.R.; ZARPELON, A.C.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI, W.A.Jr.; Kaurenoic Acid from Sphagneticola trilobata Inhibits Inflammatory. Effect on Cytokine Production and Activation of the NO–Cyclic GMP–Protein Kinase G–ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. **J. Nat. Prod.**, v.75, p.896–904, 2012.

MONCADA, S.; FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. Prostaglandins, aspirinlike drugs and the oedema of inflammation. **Nature**, v.246, p.217–219, 1973.

MORCELLE, S.R.; CAFFINI, N.O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of Funastrum clausum latex. **Fitoterapia**, v.75, p.480-493, 2004.

MOREAU, M.E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, p. 6-38, 2005.

MOTA, M.R.L.; CRIDDLE, D.N.; ALENCAR, N.M.N.; GOMES, R.C.; MEIRELES, A.V.P.; SANTI-GADELHA, T. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from Araucaria angustifolia seeds via mast cells. **N-S Arch. Pharmacol.**, v.374, p.1-10, 2006.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H.; A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v.135, n. 2, p.145-153, 1987.

NAKAMURA, M.; LICO, M.C. Mechanism of peripheral pain in the conscious guinea pig: effect of propranolol. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 19, p. 451-453, 1986.

NAPIMOGA, M.H.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; MOTA, M.L.; BITENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C. Lonchocarpus sericeus lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokines and chemokines production. **Int. Immunopharmacol.**, v.7, p.824-835, 2007.

NOBACK, C.R.; STROMINGER, N. L.; DAMAREST, R.J.; RUGGIERO, D. A. Pain and temperature. In: NOBACK, C.R.; STROMINGER, N. L.; DAMAREST, R.J.; RUGGIERO, D. A. **The human nervous system: structure and function**. 5<sup>th</sup> ed. New York: Williamns & Wilkins, 1996. cap. 9, p.155-175.



NUNES, B. S.; RESONNET, N.S.; DAL-SESSO, D.; VIEIRA, S.M.; CACADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **N-S Arch. Pharmacol.**, v.379, p.609–616, 2009.

OHGAMI, Y.; ZYLSTRA, C.C.; QUOCK, L.P.; CHUNG, E.; SHIRACHI, D.Y.; QUOCK, R.M. Nitric oxide in hyperbaric oxygen-induced acute antinociception in mice. **Neuroreport**, v. 20, p. 1325–1329, 2009.

OLIVEIRA, R.S.B.; FIGUEIREDO, I.S.T.; FREITAS, L.B.N.; PINHEIRO, R.S.P.; BRITO, G.A.C.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V.; RALPH, M.T.; LIMA-FILHO, J.V. Inflammation induced by phytochemical proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflamm. Res.**, v.61, p.689–698, 2012.

OLIVEIRA, J.S.; BEZERRA, D.P.; FREITAS, T.C.D.; MARINHO-FILHO, J.D.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; RAMOS, M.V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicol In Vitro**, v.21, p.1563-1573, 2007.

OLIVEIRA, J.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; BEZERRA, D.P.; ALENCAR, N.M.; MARINHO-FILHO, J.D.; FIGUEIREDO, I.S.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ALVES, A.P.; RAMOS, M.V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v.382, p.139-149, 2010.

PADHY, B.M.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, V.L. *Calotropis procera* latex affords protection against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.113, p.498-502, 2007.

PALMER, G.; GABAY, C.; IMHOF, B. A. Leukocyte migration to rheumatoid joints: enzymes take over. **Arthritis Rheum.**, v.54, p.2707–2710, 2006.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br. J. Pharmacol.**, v.126, p.537-550, 1999.

PARIHAR, G.; SHARMA, A.; GHULE, S.; SHARMA, P.; DESHMUKH, P.; SRIVASTAVA, D.N. Anti inflammatory effect of *Calotropis procera* root bark extract. *Asian Journal of Pharmacy*. **Life Sci.**, v.1, p.29-44, 2011.

PARRATT, 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, egg-white and compound 48/80. **Br. J. Pharmacol.**, v.13, p.65-70, 1958.

PATEL, A.K.; SINGH, V.K.; JAGANNADHAM, M.V. Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Ipomoea carnea* (morning glory). **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p.5809–5818, 2007.

PEREIRA, L.S.; GOMES, M.V.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P.; XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. Arg. **Rev. Bras. Bot.**, v.22, p.1-8, 1999.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytol**, v. 177, p.877-888, 2008.

POSCH, A.; CHEN, Z.; WHEELER, C.; DUNN, M. J.; RAULF-HEIMSOTH, M.; BAUR, X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.99, p.385-395, 1997.

PRADO, G.N.; TAYLOR, L.; ZHOU, X.; RICUPERO, D.; MIERKE, D.F. POLGAR, P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. **J. Cell. Physiol.** v. 193, p. 275-286, 2002.

PUJOL, J.P.; CHADJICHRISTOS, C.; LEGENDRE, F.; BAUGE, C.; BEAUCHEF, G. ANDRIAMANALIJOANA, R.; GALERA, P.; BOUMEDIENE, K. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. **Connect Tissue Res.**, v. 49, n. 3, p. 293-297, 2008.

RAE, G.A.; HENRIQUES, M.G.M.O. Endothelins in inflammation. In: SAID, S. (Ed.). **Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Peptides**. 5<sup>th</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1998.

RAFFA, R.B.; JACOBY, H.I. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. **Life Sci.**, v. 48, p.85-90, 1991.

RAGHAVENDRA, V.; DELEO, J.A.; HERTZ, L. The role of astrocytes and microglia in persistent pain. In: HERTZ, L. (Ed.). **Non-neuronal Cells in the Nervous System: Function and Dysfunction**. Amsterdam: Elsevier, 2003. p. 951–966.

RAMACHANDRA, S.S.; AHMED, A.Q.; VISWANATH, A.H.M.S.; PATIL, T.; PRAKASH, T.; PRABHU, K.; VEERAN, A.G. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v.78, p.451-454, 2007.

RAMOS, M.V.; VIANA, C.A.; SILVA, A.F.; FREITAS, C.D.; FIGUEIREDO, I.S.; OLIVEIRA, R.S.; ALENCAR, N.M.; LIMA-FILHO, J.V.; KUMAR, V.L. Proteins derived from latex of *Calotropis procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 385, p.455-463, 2012.

RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, E.A.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; FREITAS, C.D.T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod Plant Interact**, v.4, p.57-67, 2010.

RAMOS, M.V.; OLIVEIRA, J.S.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; KUMAR, V.L.; BITTENCURT, F.S.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, R.S.B.; BOMFIM, L.R.; LIMA-FILHO, J.V.; RAMOS, M.V. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **J. Ethnopharmacol.**, v.125, p.1-10, 2009.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J. Ethnopharmacol.**, v.68, p.261-266, 1999.

RASMANN, S.; JOHNSON, M.D.; AGRAWAL, A.A. Induced responses to herbivory and jasmonate in three milkweed species. **J. Chem. Ecol.**, v.35, p.1326–1334, 2009.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zimozan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 387, p. 111-118, 2000a.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v.391, p.97–103, 2000b.

RICHTER, F.; NATURA, G.; LOSER, S.; SCHMIDT, K.; VIISANEN, H.; SCHAIBLE, H.G. Tumor necrosis factor causes persistent sensitization of joint nociceptors to mechanical stimuli in rats. **Arthritis Rheum.**, v. 62, n. 12, p. 3806-3814, 2010.

RITONJA, A.; BUTLER, D.J.; RAWLINGS, N. D.; TURK, V.; BARRET, A. J. Papaya proteinase IV amino acid sequence. **Febs Lett.**, v. 258, p.109-112, 1989.

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 10, p.3680-3685, 2004.

SACHS, D.; COELHO, F.M.; COSTA, V.V.; LOPES, F.; PIMHO, V.; AMARAL, F.A.; SILVA, T.A.; TEIXEIRA, A.L.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. Cooperative role of tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v.162, p.72-83, 2011.

SALTER, M.W. Cellular signaling pathways of spinal pain neuroplasticity as target for analgesic development. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.5, p.1-11, 2005.

SALUNKE B.K.; KLOTKAR H.M.; MENDKI P.S.; UPASANI S.M.; AHESHWARI V.L. Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes. **Crop. Prot.**, v.24, p.888-893, 2005.

SAUNDERS, B.M.; TRAN, S.; RUULS, S.; SEDGWICK, J.D.; BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. **J. Immunol.**, v.174, p.4852-4859, 2005.

SCHIFFRIN, E.L. Vascular endothelin in hypertension. **Vasc. Pharmacol.**, v. 43, n.1, p. 19-29, 2005.

SEHGAL, R.; ARYA, S.; KUMAR, V.L. Inhibitory effect of extracts of latex of *Calotropis procera* against *Candida albicans*: A preliminary study. **Indian J. Pharmacol.**, v.37, p.334-335, 2005.

SEIBER, J.N.; NELSON, C.J.; MARK LEE, S. Cardenolides in the latex leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v.21, p.2343-2348, 1982.

SEMEGEN, S.T.; MORTON, M. Natural rubber. In: MORTON, M. (Ed.). **Rubber technology**. 2<sup>nd</sup> ed. Florida: R. E. Krieger, 1978. p.152-177.

SEN, T.; BASU, A.; CHAUDURI, A.K. Studies on the possible mechanism of the gastric mucosal protection by *Calotropis procera* involvement of 5-lipoxygenase pathway. **Fundam. Clin. Pharm.**, v.12, p.82-87, 1998.

SETHI, A.; MCAUSLANE, H.J.; RATHINASABAPATHI, B.; NUSSLY, G.S.; NAGATA, R.T. Enzyme induction as a possible mechanism for latex-mediated insect resistance in romaine lettuce. **J. Chem. Ecol.**, v.35, p.190-200, 2009.

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In-vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v.71, p.77-79, 2000.

SHUKLA, O.P.; MURTI, C.R.K. Properties & partial purification of a bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera* (Madar). **J. Sci. Ind. Res.**, v.20, p.109-112, 1961.

SMIT, H.F.; WOERDENBAG, H.J.; SINGH, R.H.; MEULENBELD, G.L.; LABADIE, R.P.; ZWAVING, J.H. Ayurvedic herbal drugs with possible cytotoxic activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.47, p.75-84, 1995.

SINGH, A.N.; SHUKLA, A.K.; JAGANNADHAMB, M.V.; DUBEY, V.K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochem.**, v.45, p.399-406, 2010.

SRINIVASAN, K.; MURUGANANDAN, S.; LAL, J.; CHANDRA, S.; TANDAN, S.K.; PRAKASH, V.R. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. **J. Ethnopharm.**, v.78, p.151-157, 2001.

SOARES, P. M.; LIMA S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI B. A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS S. M. M. Anti-nociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.99, p.125-129, 2005.

SOUTO, F.O.; ZARPELON, A.C.; STAURENGO-FERRARI, L.; CASAGRANDE, V.F.R.; FONSECA, M.J.V.; CUNHA, T.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; TÉLEPHORE, B.; NGUELEFACKA, R.C.; DUTRAB, A.F.; BASZCUKB, E.L.A.; TAPONDJOU, L.A.; CALIXTOB, J.B. Antinociceptive activities of the methanol extract of the bulbs of *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa* in mice is dependent of NO–cGMP–ATP-sensitive-K<sup>+</sup> channel activation. **J. Ethnopharmacol.**, v.128, p.567-574, 2010.

STERANKA, L.R.; MANNING, D.C.; De HAAS, C.J.; FERKANY, J.W.; BOROSKY, S.A.; CONNOR, J.R.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; SNYDER, S.H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, p. 3245-3249, 1988.

SUSSMAN, G. L.; BEEZHOLDB, D. H.; LISSC, G. Latex allergy: historical perspective. **Methods**, v.27, p.3-9, 2002.

TANAKA, D.; KAGARI, T.; DOI, H.; SHIMOZATO, T. Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide induced arthritis. **Immunology**, v.119, p.195–202, 2006.

TOBIN, A. M.; KIRBY, B. TNF alpha inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. **BioDrugs**, v. 19, n. 1, p. 47–57, 2005.

TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M.V. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, p.1479–1487, 2008.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 251, p. 173-179, 1994.

TOUR, N.; TALELE, G. Anti-inflammatory and gastromucosal protective effects of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) stem bark. **J. Nat. Med.**, v.65, p.598-605, 2011.

TURNBACH, M.E.; RANDICH, A. The role of spinal neurokinin-1 and glutamate receptors in hyperalgesia and allodynia induced by prostaglandin E(2) or zymosan in the rat. **Pain**, v. 97, p. 127-137, 2002.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of pain. **Med. Clin. North Am.**, v. 91, p.1-12, 2007.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. **Int. J. Tissue React.**, v.20, p.3-15, 1998.

- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, p.1-10, 1995.
- VAN QUAQUEBEKE, E.; SIMON, G.; DEWELLE, A.J.; YAZIDI, M.E.; BRUYNAEEL, F.; TUTI, J.; NACOULMA, O.; GUISSOU, P.; DECAESTECKER, B.J.C.; KISS, R.F. Identification of a novel cardenolide (200 -Oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. **J. Med. Chem.**, v.48, p.849–856, 2005.
- VENTURA-MARTINEZ, R.; DECIGA-CAMPOS, M.; DIAZ-REVAL, M.I.; GONZALEZ-TRUJANO, M.E.; LOPEZ-MUNOZ, F.J. Peripheral involvement of the nitric oxide–cGMP pathway in the indomethacin-induced antinociception in rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v.503, p.43–48, 2004.
- VERRI JUNIOR, W.A.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; Ferreira, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacol. Ther.**, v. 112, p. 116-138, 2006.
- VERRI JUNIOR, W.A. Quercetin Reduces Neutrophil Recruitment Induced by CXCL8, LTB4, and fMLP. **Inhibition of Actin Polymerization**, v. 25, p.113-118, 2011.
- VERRI JUNIOR, W. A.; SHIVO, I.R.; CUNHA, T.M.; LIEW, F.Y.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ETB receptors in a morphine-sensitive manner. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 310, n. 2, p. 710-717, 2004.
- VILCEK, J. The cytokines: an overview. In: THOMSON, A. W.; LOTZE, M. T. (Ed.). **The cytokines handbook**. 4<sup>th</sup> ed. London: Academic Press, 2003. v. 1, p.3-18.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. **Fed. Proc.**, v.35, p. 2447-2456, 1976.
- Von FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunktionen der menschlichen Haut. **Abhandl. Sachs. Ges. Wiss.**, v. 23, p. 175-266, 1896.
- WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. 4<sup>th</sup> ed. London: Churchill Livingstone, 1999.
- WALLACE, J. L.; MORRIS, G.P.; BECK, P.L.; WILLIAMSON, T.E.; GINGRAS, G.R. Effects of sucralfate on gastric prostaglandin and leukotriene synthesis: relationship to protective actions. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 66, n. 5, p. 666-670, 1988.
- WALZ, C.; GIAVALISCO, P.; SCHAD, M.; JUENGER, M.; KLOSE, J.; KEHR, J. Proteomics of cucurbit phloem exudates reveals a network of defence proteins. **Phytochemistry**, v.65, p.1795–1804, 2004.

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neurosci.**, v.24, p.450–455, 2001.

WEDMORE, C. V.; WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature*, v.289, p.646–650, 1981.  
WHITE, F.A.; BHANGOO, S.K.; MILLER, R.J. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nat. Rev. Drug Disco**, v.4, p.834–844, 2005.

WILLIAMS, T.J.; MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature**, v.246, no.5430, p.215–217, 1973.

WONG, D.; PRAMEYA, R.; DOROVINI-ZIS, K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.58, p.138-152, 1999.

XIE, W.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D. L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.2692-2696, 1991.

ZANONI, I.; OSTUNI, R.; BARRESI, S.; DI GIOIA, M.; BROGGI, A.; COSTA, B.; MARZI, R.; GRANUCCI, F. CD14 and NFAT mediate lipopolysaccharide-induced skin edema formation in mice. **J. Clin. Invest.**, v.122, p.1747-1757, 2012.

ZHANG, Y.; QUOCK, L.P.; CHUNG, E.; OHGAMI, Y.; QUOCK, R.M. Involvement of a NO- cyclic GMP-PKG signaling pathway in nitrous oxide-induced antinociception in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.11, p. 249-253, 2011.

ZWEIFLER, J. A. Objective evidence of severe disease: opioid use in chronic pain. **Ann. Fam. Med.**, p. 10, n. 4, p. 366-368, 2012.