



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Herissantia crispa* (L.) Brizicky
EM CAMUNDONGOS.

CHARLANE KELLY SOUTO PEREIRA

JOÃO PESSOA
2013

CHARLANE KELLY SOUTO PEREIRA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Herissantia crispa* (L.) Brizicky
EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do
Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Paraíba, para obtenção do grau de
DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de
Concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADORES: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Prof^a. Dr^a. Temilce Simões de Assis

**JOÃO PESSOA
2013**

CHARLANE KELLY SOUTO PEREIRA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Herissantia crisper* (L.) Brizicky
EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba,
para obtenção do grau de DOUTOR EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de
Concentração: FARMACOLOGIA

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Orientador - UFPB

Prof^a. Dr^a. Temilce Simões de Assis
Orientadora - UFPB

Prof. Dr. Fábio Fagundes da Rocha
Examinador Externo - UFRRJ

Prof. Dr. Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Examinador Externo - UFPB

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares
Examinadora Interna - UFPB

Prof^a. Dr^a. Celidarque da Silva Dias
Examinadora Interna - UFPB

*Aos meus pais, Antonio e Sonia,
por todo amor e dedicação com
que cuidam de mim, meus mestres na vida e
responsáveis por tudo que sou hoje .
Amo vocês!!!*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a **Nossa Senhora** por todas as bênçãos que me proporcionam, por serem meu amparo e força nas horas de desânimo, sempre me guiando pelo melhor caminho. Obrigada pela presença constante em minha vida!

Aos meus pais, **Antonio e Sonia**, por todo amor, por tudo que me ensinaram em toda minha vida me transformando na pessoa que sou hoje. Obrigada pela determinação de me fazerem feliz, por acreditarem em mim, pelas palavras e gestos de carinho e incentivo. Essa conquista é nossa!

Ao meu irmão, **Weverton Rubens**, pelo amor e cuidado, sempre torcendo pela minha vitória;

A toda **minha família**, ao meu avô João Pereira, tios e primos, pelo carinho e por sempre me colocarem em suas orações. Em memória aos meus avós (José Paulo, Maria Augusta e Maria de Lurdes) e meu querido tio Fernando José, sei que todos ficariam muito felizes e orgulhosos com minhas conquistas;

Ao meu namorado, **Uirá Paiva**, por todo amor, cuidado, compreensão e apoio em todos os momentos que precisei e por está sempre tão presente desde o dia em que nos conhecemos;

A minha orientadora, **Prof^a. Temilce Simões de Assis**, pela orientação e ensinamentos durante o mestrado e doutorado, por ter acreditado na minha capacidade e por toda confiança depositada em mim, muito obrigada por ter me acompanhado durante toda minha pós-graduação;

Ao meu orientador, **Prof. Reinaldo Nóbrega de Almeida**, que me acolheu nesta orientação e pela confiança. Agradeço não apenas pelos conhecimentos científicos, mas por ser referência de profissional com admirável postura ética;

A **Profª. Maria de Fátima Vanderlei Souza** e sua equipe, em especial a **Wemerson Matias e Yanna Teles**, pelo fornecimento da substância estudada e por todo apoio técnico.

A **Profa. Márcia Regina Piuvezam**, pela parceira para a realização dos testes anti-inflamatórios e a **Fagner Carvalho**, pela disponibilidade e boa vontade de me auxiliar em todos estes testes;

Aos meus professores da Pós-Graduação, pelo conhecimento transferido e por contribuir na minha formação profissional;

Aos **membros da banca examinadora da qualificação e da defesa** desta tese, pela disponibilidade e por todas as contribuições dadas com as correções e sugestões.

A minha **turma de doutorado**, pelo companheirismo e amizade;

Aos amigos da Psicofarmacologia, **Mírian Salvadori, Paula Salgado, Fabíola Lélis, Lucas Monte, Camila Carolina, Sócrates Gólzio, Mateus Feitosa**, que se tornaram verdadeiros amigos, me ajudaram muito durante a realização deste trabalho, tornando meus dias na pós-graduação mais tranquilos e alegres. Agradeço ainda aos queridos amigos, **Franklin Nóbrega (Best), Vanine Mota, Rubens Benedito, Flávia Negromonte, Ana Karina** e todos os **alunos da iniciação científica**, em especial **Aline Kely, Sara Mirtyla e Vanessa Morais**, que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos anjos amigos, **Adriana Maria, Fábio Tenório, Rosângela Penha e Diogo Vilar**, que são sempre generosos em me ajudar e que têm por mim uma amizade incrível, não só na pós-graduação como na minha vida pessoal. Obrigada pela imensa contribuição para que eu pudesse concluir esse trabalho;

A prima **Mariana Souto** e amigos **Nathalia Jataí, Mariana Doso, Viviane Emanuele, Cláudia Cardoso, Sara Alves, Anne Daniella, Carlos Olívio, Mirely Ranne, Gregório Fernandes, Steno Lacerda, Kleson Fernandes**, que estando longe ou perto sempre torceram por mim. Obrigada pelo apoio, consolo, paciência e carinho

nas horas que precisei e por tornarem meus dias mais divertidos. Vocês são uma família pra mim;

Ao querido amigo **José Crispim Duarte** pelo carinho e amizade cultivados durante esses anos de convivência e cuja ajuda e disponibilidade foram imprescindíveis para a realização deste trabalho;

Aos funcionários e técnicos do Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/UFPB, pela ajuda na realização deste trabalho;

A CAPES pelo apoio financeiro;

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser realizado.

Porque não faria este trabalho sozinha.

Muito obrigada!

Charlane Souto!

*Instruir-te ei e ensinar-te-ei o caminho que
deves seguir, guiar-te ei os com meus olhos.”
(Salmo 32:8)*

RESUMO

PEREIRA, Charlane Kelly Souto. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Herissantia crispera* (L.) Brizicky em camundongos**. 2013. 122 p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) UFPB/ CCS, João Pessoa – PB. Orientadores: Reinaldo Nóbrega de Almeida e Temilce Simões de Assis.

A *Herissantia crispera* (L.) Brizicky (Malvaceae), é composta por substâncias que apresentam atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante comprovadas. Há poucos relatos desta planta na literatura, mas já foi determinado, em estudos anteriores, que *H. crispera* apresenta características de fármacos com perfil sedativo-hipnótico e antinociceptivo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antinociceptivo da *H. crispera*, utilizando a fase acetato de etila da *H. crispera* (FAEHc), a fase hidroalcoólica (FHAHc) e dois flavonóides isolados desta planta (tilirosídeo e lespedina), assim como, os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade, além do efeito anti-inflamatório. Para a determinação dos mecanismos de ação antinociceptivos e da atividade anti-inflamatória usou-se apenas a FAEHc. Os experimentos realizados em camundongos demonstram que a FAEHc, a FHAHc e os flavonóides administrados por via i.p., promoveram antinocicepção significativa no teste da formalina, porém, este efeito foi mais pronunciado com a FAEHc, que também mostrou significativa redução na nocicepção induzida pelo glutamato. A antinocicepção produzida pela FAEHc foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com cafeína, atropina e L-arginina sugerindo envolvimento dos sistemas adenosinérgico, muscarínico e oxidonitrérgico, respectivamente. Contudo, a resposta antinociceptiva da FAEHc não foi bloqueada quando os animais foram pré-tratados com naloxona, ioimbina e glibenclamida, indicando que a FAEHc provavelmente não atua por essas vias. O tratamento dos animais com a FAEHc promoveu significativa redução do edema de pata induzido pela carragenina nas primeiras 48 horas do teste. Além disso, a FAEHc diminuiu significativamente a migração leucocitária, particularmente o influxo de neutrófilos, e os níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β no modelo da peritonite induzida por carragenina. Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, fica evidente que a FAEHc, a FHAHc e os flavonóides lespedina e tilirosídeo, marcadores químicos desta planta, apresentam atividade antinociceptiva, porém não se pode atribuir tal efeito exclusivamente aos marcadores, uma vez que o efeito apresentado foi inferior ao apresentado pelas fases e extrato bruto. E a antinocicepção induzida pela FAEHc possivelmente envolve ativação de receptores adenosinérgicos, de receptores muscarínicos e a via que envolve o óxido nítrico. Além disso, a FAEHc é capaz de promover controle da inflamação, e esse efeito está relacionado com a redução do influxo de leucócitos para o local da inflamação que pode ser atribuída a inibição da produção das citocinas TNF- α e IL-1 β .

Palavras-chave: *Herissantia crispera*, atividade antinociceptiva, atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

PEREIRA, Charlane Kelly Souto. **Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Herissantia crispa* (L.) Brizicky in mice**. 2013. 122 p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) UFPB/ CCS, João Pessoa – PB. Orientadores: Reinaldo Nóbrega de Almeida e Temilce Simões de Assis.

The *Herissantia crispa* (L.) Brizicky (Malvaceae), is composed of substances that have proven activities, such as anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant. There are few reports in the literature of this plant, but previous studies have determined, that *H. crispa* characteristics of drugs with antinociceptive and sedative-hypnotic profile. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive effect of *H. crispa*, using the ethyl acetate phase from *H. crispa* (FAEHc), hydroalcoholic phase (FHAHc) and two flavonoids isolated from this plant (tiliroside and lespedin), as well as the possible mechanisms involved in this activity and the anti-inflammatory effect. To determine the antinociceptive mechanisms of action and the anti-inflammatory activity only FAEHc was used. The experiments conducted in mice demonstrate that FAEHc, FHAHc and flavonoids, injected via i.p., promoted significantly antinociception in the formalin test, and also showed a significantly reduction in the glutamate-induced nociception. The antinociception produced by FAEHc was significantly reversed by pretreatment of animals with caffeine, atropine or L-arginine suggesting involvement of adenosinergic, muscarinic and oxidonitrergic systems, respectively. However, FAEHc antinociceptive response was not blocked when animals were pretreated with naloxone, yohimbine and glibenclamide, indicating that FAEHc probably is not acting through these pathways. The treatment of animals with FAEHc promoted significant reduction of the paw edema induced by carrageenan in the first 48 hours of the test. Furthermore, FAEHc significantly decreased leukocyte migration, particularly the influx of neutrophils, and the levels of TNF- α and IL-1 β in the model of peritonitis induced by carrageenan. Considering the results obtained in this study, is evident that FAEHc, FHAHc and flavonoids lespedin and tiliroside, chemical markers of this plant, have antinociceptive activity, but this effect cannot be attributed only to the markers, since the effect was lower than that shown by the phases and the crude extract. Also, the antinociception induced by FAEHc possibly involves activation of adenosine and muscarinic receptors as well as the nitric oxide pathway. Furthermore, FAEHc is capable of promoting a reduction of inflammation, and this effect is related to the reduction of leukocyte influx to the site of inflammation that could be attributed to inhibiting of the production of TNF- α and IL-1 β .

Keywords: *Herissantia crispa*, antinociceptive activity, anti-inflammatory activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
ACh	Acetilcolina
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil- 4-isoxazolpropionato
AMPC	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene Calcitonina
COX-2	Ciclooxigenase -2
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
e.p.m.	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAEHc	Fase Acetato de Etila de <i>Herissantia crisper</i>
FHAHc	Fase Hidroalcoólica de <i>Herissantia crisper</i>
GABA	Ácido γ Amino Butírico
IASP	International Association for the Study of Pain
ICAM-1	Molécula de Adesão Intracelular-1
IL-1β	Interleucina -1β
IL-8	Interleucina – 8
IL-10	Interleucina – 10
IL-18	Interleucina – 18
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
i.p.	Intraperitoneal
K⁺_{ATP}	Canal de potássio ativado por ATP
K⁺_{ir}	Canal de potássio retificador de entrada
K⁺_v	Canal de potássio dependente de voltagem
L-NOARG	N ^o – nitro – L – arginina
mg/kg	Miligramas por Quilogramas
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NMDA	N-metil-D-aspartato

nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PGI2	Prostaglandina I2
PGs	Prostaglandinas
SBDE	Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento- β
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fibras aferentes primárias.....	26
Figura 2. Esquema simplificado do circuito nociceptivo.....	28
Figura 3. Teoria da comporta proposta por Melzack e Wall em 1965.....	29
Figura 4. Processo de migração dos leucócitos.....	33
Figura 5. Partes aéreas de <i>H. crisper</i> L. (Brizicky).....	37
Figura 6. Flavonóides isolados da <i>H. crisper</i>	38
Figura 7. Camundongo Swiss.....	44
Figura 8. Resumo esquemático do estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da espécie <i>H. crisper</i> em camundongos.....	47
Figura 9. Efeito da FAEHc (750 mg/kg, i.p), FHAHc (750 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	56
Figura 10. Efeito da FAEHc (750 mg/kg, i.p), FHAHc (750 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	57
Figura 11. Efeito da FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg, i.p) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	58
Figura 12. Efeito da FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg, i.p) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	58
Figura 13. Efeito da lespedina (25 e 50 mg/kg, i.p), tilirosídeo (25 e 50 mg/kg, i.p.), lespedina com tilirosídeo (25 e 50 mg/kg, i.p., respectivamente) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	59
Figura 14. Efeito da lespedina (25 e 50 mg/kg, i.p), tilirosídeo (25 e 50 mg/kg, i.p.), lespedina com tilirosídeo (25 e 50 mg/kg, i.p., respectivamente) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	60
Figura 15. Efeito da FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg, i.p) e MK801 (0,03 mg/kg, i.p.) no teste do glutamato em camundongos.....	61
Figura 16. Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	62

Figura 17. Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	62
Figura 18. Efeito do pré-tratamento com cafeína (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	63
Figura 19. Efeito do pré-tratamento com cafeína (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	64
Figura 20. Efeito do pré-tratamento com atropina (5 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	65
Figura 21. Efeito do pré-tratamento com atropina (5 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	66
Figura 22. Efeito do pré-tratamento com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	67
Figura 23. Efeito do pré-tratamento com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	68
Figura 24. Efeito do pré-tratamento com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	69
Figura 25. Efeito do pré-tratamento com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	69
Figura 26. Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina em camundongos.....	70
Figura 27. Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina em camundongos.....	71
Figura 28. Efeito da administração da FAEHc (250, 500, 750 mg/kg, i.p) e da dexametasona (2 mg/kg , s.c.) no edema de pata induzida por carragenina nas primeiras 6 horas após os tratamentos, em camundongos.....	72

Figura 29. Efeito da administração da FAEHc (250, 500, 750 mg/kg, i.p) e da dexametasona (2 mg/kg , s.c.) no edema de pata induzida por carragenina 24, 48 e 72 horas após os tratamentos, em camundongos.....73

Figura 30. Efeito da administração da FAEHc (250, 500, 750 mg/kg, i.p) e da dexametasona (2 mg/kg , s.c.) sobre a migração de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares, na peritonite induzida por carragenina, em camundongos.....74

Figura 31. Efeito da administração da FAEHc (250, 500, 750 mg/kg, i.p) e da dexametasona (2 mg/kg , s.c.) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β , no modelo de peritonite induzida por carragenina., em camundongos.....76

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	12
1 INTRODUÇÃO	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1 DOR E NOCICEPÇÃO	23
2.1.2 VIAS DE TRANSMISSÃO DA DOR	25
2.2 INFLAMAÇÃO.....	30
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE MALVACEAE E <i>Herissantia crispa</i>	35
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAL	43
4.1 PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO, FASES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	43
4.2 ANIMAIS	44
4.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	44
4.4 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	45
4.5 APARELHAGEM	46
4.6 OUTROS MATERIAIS.....	46
5 MÉTODOS.....	47
5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	48
5.1.1 TESTE DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA	48

5.1.2	TESTE DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO GLUTAMATO	49
5.1.3	AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE <i>Herissantia crista</i>	49
5.1.3.1	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OPIÓIDE	50
5.1.3.2	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ADENOSINÉRGICO	50
5.1.3.3	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA MUSCARÍNICO	50
5.1.3.4	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OXIDONITRÉRGICO	51
5.1.3.5	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA α_2 -ADRENÉRGICO	51
5.1.3.6	PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE K^+_{ATP}	51
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	52
5.2.1	EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	52
5.2.2	PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA	52
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
6	RESULTADOS	56
6.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	56
6.1.1	EFEITO DAS FAEHc e FHAHc NO TESTE DA FORMALINA.....	56
6.1.2	EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FAEHc NO TESTE DA FORMALINA.....	59
6.1.3	EFEITO DA FAEHc NO TESTE DO GLUTAMATO.....	60
6.1.4	AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE <i>Herissantia crista</i>	61
6.1.4.1	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OPIÓIDE	61
6.1.4.2	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ADENOSINÉRGICO	63
6.1.4.3	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA MUSCARÍNICO	64
6.1.4.4	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OXIDONITRÉRGICO	66
6.1.4.5	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA α_2 -ADRENÉRGICO	68
6.1.4.6	PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE K^+_{ATP}	70
6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	71

6.2.1 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	71
6.2.2 PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA	73
6.2.3 NÍVEIS DE CITOCINAS TNF- α E IL-1 β NO LAVADO PERITONEAL	75
7 DISCUSSÃO.....	78
8 CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS.....	122

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A dor desempenha um papel fisiológico fundamental, sendo um dos fatores responsáveis pelo controle da homeostasia do organismo. A sensação dolorosa representa um dos principais sinais clínicos e funciona como um sistema de alerta quando qualquer fator ameaça a integridade física do organismo. Normalmente, quando ocorre dano tecidual, a dor será acompanhada de inflamação. A reação inflamatória é uma resposta do organismo a um processo infeccioso ou agressão tecidual na tentativa de restabelecer a homeostasia (CHAPMAN; GRAVRIN, 1999; JULIUS, BASBAUM, 2001).

A dor manifesta-se de forma subjetiva por sofrer influência de experiências prévias, que determinaram a individualidade de sua expressão por cada pessoa. Engloba sensações físicas e psíquicas, tornando difícil sua definição e tratamento (CÂMARA, 2009). Substâncias com ação analgésica apresentam um importante papel no tratamento da dor, considerado um problema de saúde pública. Abordagens terapêuticas diversas têm sido utilizadas com a finalidade de atenuá-la, uma vez que a dor relacionada a diferentes condições patológicas representa o sintoma que mais causa sofrimento aos indivíduos (BRENANN; CARR; COUSINS, 2007; TRACEY; MANTYH, 2007).

Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), a dor atinge pelo menos 30% das pessoas durante algum momento de suas vidas e, 10 a 40% dos casos tem duração superior a um dia. A estatística oficial da dor no Brasil ainda é inexistente, mas sua ocorrência tem aumentado nos últimos anos, constituindo a principal causa de limitação, incapacitação para o trabalho, sofrimento, gerando graves consequências psicossociais e econômicas (SBED, 2009).

O desenvolvimento de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios tem sido importante objeto de estudo por muitos grupos de pesquisa, e as plantas medicinais surgem como uma fonte muito promissora de compostos com propriedades farmacológicas.

Princípios ativos de substâncias com estruturas químicas variadas foram isoladas de plantas destacadas por suas atividades biológicas e/ou farmacológicas. A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, entre outros, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações

farmacológicas através de diversos testes pré-clínicos com animais (CALIXTO et al., 1990; SAMUELSSON, 1992; CECHINEL-FILHO, 1995, ALMEIDA et al., 2000, FAUSTINO; ALMEIDA; ANDREATINI, 2010; ALMEIDA; NAVARRO; BARBOSA-FILHO, 2001; SOUTO et al, 2011; SILVA et al., 2009; OLIVEIRA; SOUZA; ALMEIDA, 2008; BARRETO; FRAGA; ARAÚJO, 2004; ROCHA et al., 2005; AMARAL et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2006a,b, 2007; OLIVEIRA et al., 2007; ROCHA et al., 2007a; SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008; SOUSA et al., 2008; PEREIRA et al., 2012).

A busca da população pelas plantas medicinais incentivou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos (SOUSA et al., 2008). Portanto, há um crescente interesse da comunidade científica em elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos de plantas medicinais, tão utilizadas empiricamente, bem como de seus constituintes químicos, a fim de tornar o seu uso mais eficaz e com menos efeitos adversos (QI; WANG; YUAN, 2011).

Testes para a detecção das atividades analgésicas são importantes para o desenvolvimento de drogas a partir de plantas medicinais. Assim, inúmeros grupos de pesquisa em todo mundo tem voltado sua atenção para validação do uso de plantas medicinais e o isolamento de seus metabólitos secundários na perspectiva de encontrar substâncias similares à morfina, sem seus efeitos colaterais e economicamente acessíveis à população (OLIVEIRA, 2006; SILVA et al. 2008; CALIXTO et al., 2000).

Muitas plantas possuem promissoras atividades analgésicas. Dentre elas, há relatos da literatura mostrando ação antinociceptiva de *Dioclea grandiflora* (BATISTA; ALMEIDA; BHATTACHARYYA, 1995; ALMEIDA et al., 2000), *Cissampelos sympodialis* (OLIVEIRA JR, 2007), *Combretum leprosum* (LOPES et al., 2010), *Hypericum grandifolium* (BONKANKA; SÁNCHEZ-MATEO; RABANAL, 2011) e *Quillaja saponaria* (ARRAU et al., 2011). Outras plantas que apresentam atividade antinociceptiva também apresentam propriedades anti-inflamatórias, por exemplo, *Alpinia calcarata* (ARAWWAWALA; ARAMBEWELA; RATNASOORIYA, 2012), *Byrsonima intermédia* (ORLANDI et al., 2011), *Thespesia populnea* (SHAH; ALAGAWADI, 2011) *Adiantum latifolium* (NONATO et al., 2011) .

A *Herissantia crispa* (L.) Brizicky, planta popularmente conhecida como malvaíscio (AGRA et al, 2008), apresenta atividade antinociceptiva que foi evidenciada em estudo anterior durante o trabalho de mestrado (PEREIRA, 2009). Nesse estudo, o extrato bruto de *H. crispa* apresentou atividade antinociceptiva, em doses semelhantes

às doses testadas durante o trabalho de doutorado. Diante disso e do interesse crescente de obter novas possibilidades terapêuticas, mais eficientes e que apresentem menor toxicidade, o presente trabalho teve a finalidade de investigar o mecanismo de ação antinociceptivo da *H. crispa*, assim como, pesquisar uma possível atividade anti-inflamatória em modelos experimentais de dor e de inflamação, respectivamente, contribuindo para expansão dos conhecimentos científicos sobre essa planta.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A utilização do termo “dor” é apropriada exclusivamente para seres humanos, devido a sua forma de apresentação, envolvendo não só o componente sensorial nociceptivo, mas também um componente emocional, associados aos quadros dolorosos (COUTAUX et al., 2005). A International Association for the Study of Pain (IASP) definiu a dor como *“uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada com o dano tissular real ou potencial, ou descrita em termos deste dano”* (WILDER-SMITH, 2007). A sensação da dor normalmente acompanha a maioria das doenças que acometem os seres humanos, alertando o organismo para a presença de estímulos danosos (WOOLF; SALTER, 2000), e também tem uma conotação individual que sofre influência de experiências prévias (MERSKEY; BOGDUK, 1994).

A nocicepção é o componente fisiológico da dor e compreende os processos de transdução, transmissão e modulação do estímulo nociceptivo. Uma vez instalado o estímulo nociceptivo, diversas alterações neuro-endócrinas acontecem, promovendo um estado de hiperexcitabilidade do sistema nervoso central e periférico (KLAUMANN et al., 2008).

Dessa forma, pressupõe-se a existência de dois componentes envolvidos no processo doloroso: um é a sensação de dor ou nocicepção, induzida por estímulos nocivos, que podem ser exógenos, tais como biológicos, químicos, físicos ou ainda endógenos, caracterizados principalmente por processos inflamatórios, sendo consequência da transmissão dos citados estímulos pelas vias nervosas até o córtex cerebral. O outro componente seria a reação emocional à dor, que corresponderia à interpretação afetiva a essa sensação. Esta de caráter individual, sendo representada principalmente por experiências prévias, tais como a lembrança de alguma forma de sofrimento. A percepção final da dor será consequência da integração de ambos os componentes (MORAES; CAMARGO, 1999; BRAUN-FILHO; BRAUN, 2004). A nocicepção, portanto, refere-se à percepção consciente ou não do estímulo doloroso. Por sua vez, o processamento da dor envolve a ativação do córtex somatossensorial em

áreas responsáveis pela cognição, pela emoção e pela sensação (KUPERS; KEHLET, 2006; SCHNAKERS et al., 2012).

A percepção de dor sofre influência de muitas variáveis biológicas, tais como variações no Sistema Nervoso Central (SNC) e nos circuitos da dor (PALMEIRA; ASHMAWI; POSSO, 2011). Assim, a dor é uma sensação complexa e, por isso, há várias classificações que dividem os processos dolorosos em várias categorias, de acordo com a intensidade e a natureza do estímulo, duração, entre outros aspectos. Dentre as várias classificações, sem dúvida, a mais importante é a que divide a dor em dor aguda e dor crônica. A dor aguda é uma resposta fisiológica normal a um estímulo nocivo (CARR; GOUDAS, 1999), é de curta duração, geralmente persistente apenas no período de duração do dano tecidual e representa uma reação fisiológica natural do organismo (MERSKEY, 1994). A dor aguda é produzida após um estímulo nocivo que desencadeia na ativação de nociceptores presentes no local lesionado sendo, geralmente, limitada à área afetada (HELMS; BARONE, 2008).

A dor crônica é definida como “aquela que persiste além do tempo razoável para a cura de uma lesão”. É também descrita como aquela associada a processos patológicos crônicos, que causam dor contínua ou recorrente em intervalos de meses ou anos (MERSKEY; BOGDUK, 1994; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). A diferença entre a dor crônica e aguda, além da duração, consiste na incapacidade do sistema nervoso em restabelecer a atividade neuronal para os níveis homeostáticos normais (LOESER; MELZACK, 1999; VALE, 2000).

Há ainda, um tipo de dor denominada dor transitória. Esta dor é produzida pela ativação de nociceptores presentes na pele ou em outros tecidos na ausência de dano tecidual. Esse tipo de dor surge para proteger o homem contra danos físicos, causados pelo ambiente ou por estresse de tecidos corporais. Clinicamente, a dor transitória é incidental ou processual, como durante uma punção venosa ou injeção, tem função protetora e é onipresente na vida cotidiana, sendo que raramente é razão para procurar cuidados de saúde (LOESER; MELZACK, 1999).

2.1.2 VIAS DE TRANSMISSÃO DA DOR

O conhecimento da fisiopatologia da dor é uma importante ferramenta para o entendimento dos mecanismos desencadeantes dos processos dolorosos, sejam fisiológicos ou principalmente patológicos (SALIBA; HUBER; PENTER, 2011). Entre a exposição inicial ao estímulo nocivo até a percepção da dor, há uma série de mecanismos extremamente complexos envolvidos, os quais reconhecem o estímulo através de receptores específicos (nociceptores), estes o convertem em potencial de ação que, por sua vez, é transmitido até o SNC, onde é processado e é gerada a percepção da dor (MILLAN, 1999). Para garantir a homeostasia do organismo, uma via descendente inibitória é ativada, inibindo a transmissão excitatória nociceptiva, representando, assim, o mecanismo de antinocicepção.

Portanto, a dor compreende três mecanismos básicos: a transdução, caracterizada pela ativação dos nociceptores; a transmissão, envolvendo o conjunto de vias sensitivas e mecanismos que permitem a passagem do impulso nervoso pelos neurônios e conduzido para estruturas do SNC comprometidas com o reconhecimento da dor; e a modulação, que envolve o mecanismo de supressão da sensação dolorosa e que é desencadeado pelas próprias vias nociceptivas descendentes (FERNANDES; GOMES, 2011).

O mecanismo de nocicepção está envolvido com agressões ou lesões teciduais que resultam na liberação de inúmeros mediadores químicos, capazes de ativar ou sensibilizar nociceptores (ROCHA et al., 2007). Esses mediadores podem atuar em conjunto ou em um determinado momento do processo inflamatório, produzindo mudanças sutis que resultam em hiperalgesia (sensibilidade elevada a estímulos dolorosos) ou alodinia (sensação dolorosa causada por estímulos que habitualmente não causam dor) (CHOPADE; MULLA, 2010). Após a lesão tecidual pode haver a ativação de nociceptores através da liberação de vários neurotransmissores e neuromoduladores tais como, a substância P, peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP), glutamato, bradicinina, prostaglandinas (PGs), histamina, serotonina, e citocinas tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18) (GILCHRIST; ALLARD; SIMONE, 1996). Como resultado, a sensibilização de fibras aferentes primárias transmite a informação da dor para os neurônios do corno-dorsal e,

subsequentemente, para o centro superior do cérebro, resultando no estabelecimento da dor (BASBAUM; JESSEL, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os nociceptores são capazes de detectar estímulos químicos e físicos, estando presentes em todos os tecidos, exceto o cérebro. (BASBAUM et al., 2009). São terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias delgadas, não mielinizadas, denominadas fibras C, com baixa capacidade de condução (0,5-2 m/s) ou pouco mielinizadas, as fibras A δ , que conduzem o impulso nervoso com maior facilidade (10-30 m/s). Há ainda as fibras A β que também são mielinizadas, de grande diâmetro e de condução rápida (30 a 100 m/s), respondendo a estímulos periféricos semelhantes. A maioria dessas fibras, originárias de neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes medulares dorsais, faz sinapses com neurônios secundários do corno medular dorsal, onde os neurotransmissores são sintetizados e liberados (BESSION, 1999; MILLAN, 2002) (Figura 1).

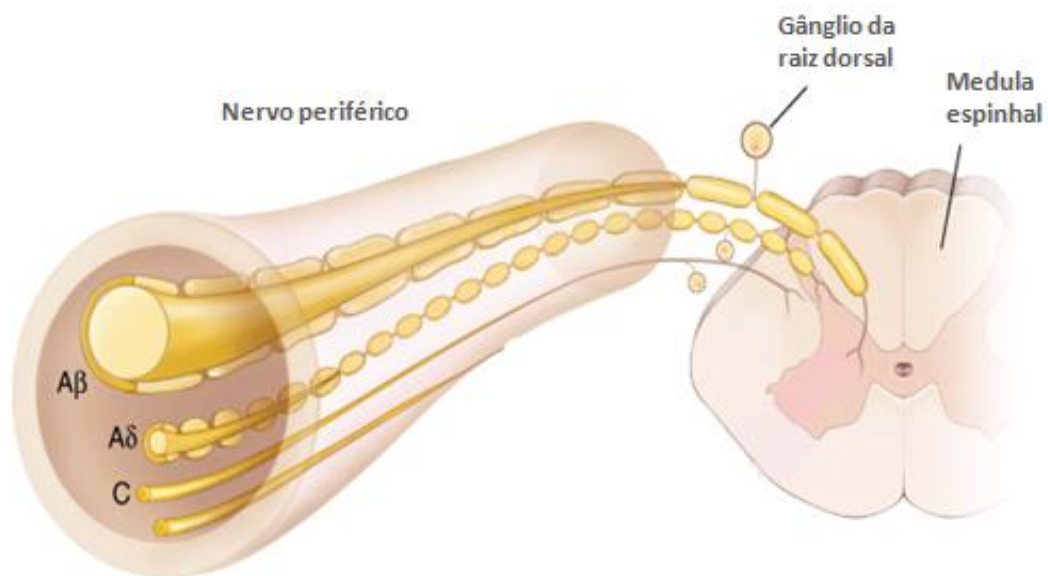


Figura 1. Fibras aferentes primárias (Fonte: Adaptado de FAUCI et al., 2008).

A transmissão através das fibras do tipo A são tão rápidas que o reflexo do corpo pode responder mais rápido que o estímulo doloroso, provocando a retração da parte do corpo afetada antes mesmo da percepção da dor (HELMS; BARONE, 2008). As fibras A δ produzem uma dor aguda bem definida, chamada de “dor rápida” ou “primeira dor”

(KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008) e são responsáveis por promover a sensação durante a dor aguda (CASEY, 2000). Após a “primeira dor”, as fibras C transmitem lentamente a sensação de queimação conhecida como “segunda dor”. Essa condução da dor ocorre vagarosamente devido ao fato dessas fibras possuírem um diâmetro pequeno e serem amielinizadas (HELMS; BARONE, 2008).

Ao contrário das fibras tipo C e A δ , as fibras A β têm um baixo limiar de ativação e, por isso, não transmitem a informação nociceptiva (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). Na ausência de dano tecidual ou nervoso, essas fibras transmitem impulsos referentes a estímulos inócuos, como tato, vibração e pressão (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

As fibras aferentes primárias se projetam no corno dorsal da medula espinhal, fazendo sinapse com neurônios secundários presentes nas lâminas. Por exemplo, as fibras A δ se projetam na lâmina I e V. As lâminas III, IV e V estão conectadas às fibras A β , que respondem a um simples toque. Já as fibras C se projetam mais superficialmente, nas lâminas I e II (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; BASBAUM et al., 2009).

Os neurônios secundários convergem pelas vias espinotalâmicas e espinobraquias aos altos centros, e, no tálamo, ocorre a sinapse com os neurônios de terceira ordem que projetam seus axônios para o córtex somatossensorial. Dentro do tálamo, a informação nociceptiva relacionada ao tipo, intensidade e localização topográfica da dor é codificada antes de enviar a informação para o sistema límbico e sítios corticais. Os impulsos do centro supraespinhal são integrados na substância cinzenta periaquedutal, que é essencial na facilitação da modulação descendente e na inibição da nocicepção, principalmente via núcleo magno da rafe (SCHOLZ; WOOLF, 2002; VANDERAH, 2007) (Figura 2).

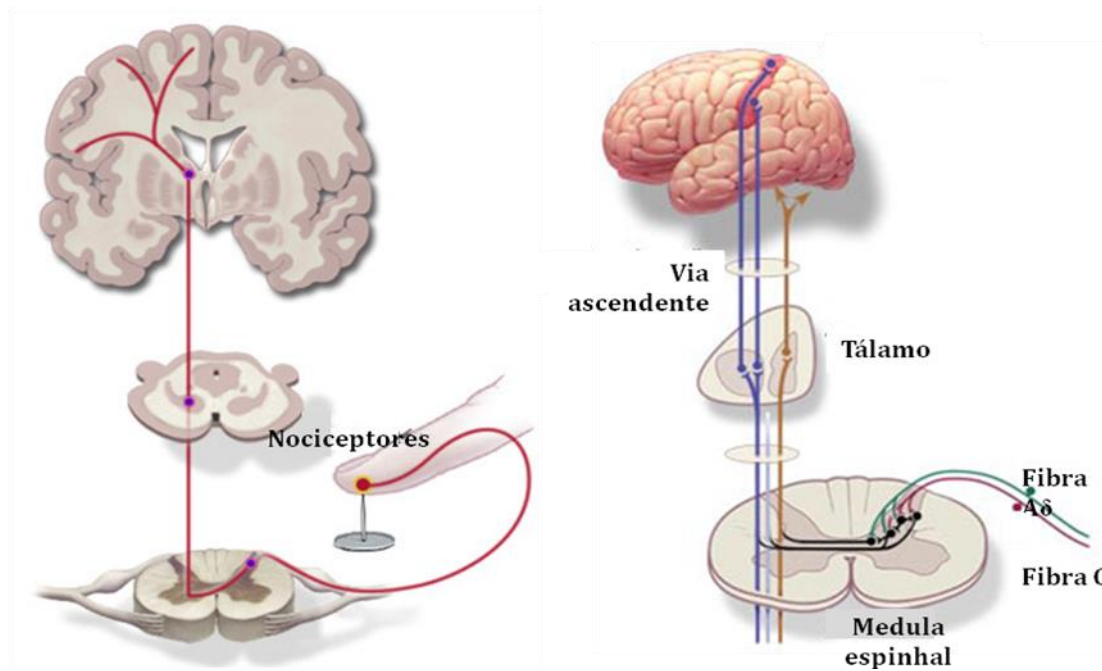


Figura 2. Esquema simplificado do circuito nociceptivo (Fonte: Adaptado de http://www.stjosephsatlanta.org/cme/pdf/ama_painmgmt_m1.pdf. Acesso em: 01/2013).

Após a percepção da dor nas regiões superiores do encéfalo, o organismo ativa um sistema de antinocicepção através de vias descendentes inibitórias que vão influenciar a transmissão do estímulo nociceptivo dos neurônios aferentes primários para o SNC. Este mecanismo representa a restauração da homeostasia (RIEDEL; NEECK, 2001).

Os sistemas endógenos de controle da dor podem ser ativados em diversas situações: estresse, doenças ou mesmo pela própria dor (VENÂNCIO, 2006). O sistema de modulação mais conhecido é denominado Teoria da Comporta proposto por Melzack e Wall em 1965, onde as fibras mielínicas grossas A β (responsáveis pela condução do tato, propriocepção e pressão) excitariam os interneurônios inibitórios da substância gelatinosa de Rolando (lâmina III), promovendo uma inibição pré-sináptica das fibras aferentes nociceptivas. Esses interneurônios podem ser inibido pela ativação das fibras nociceptivas A δ e C e ao mesmo tempo, excitam neurônios das vias de projeção da dor. Dessa forma, a ativação das fibras A β aumenta a ativação inibitória do interneurônio, fechando a comporta e bloqueando a propagação para as vias supraespinhais, enquanto a ativação das fibras A δ e C, pela inativação dos interneurônios inibitórios, podem abrir a comporta, facilitando a transmissão do sinal nociceptivo. (BASBAUM et al., 2009;

ZEILHOFER; WILDNER; YÉVENES, 2012). Esta teoria explicaria o fato de que a estimulação tátil de uma área dolorosa diminui a sensação de dor (VILELA-FILHO, 1998). Os impulsos táteis chegam à medula ao mesmo tempo que os impulsos dolorosos, por suas vias respectivas. E os impulsos táteis podem inibir a transmissão sináptica entre o neurônio primário nociceptivo e o neurônio secundário, constituindo-se assim a primeira via do controle da dor (VENÂNCIO, 2006) (Figura 3).

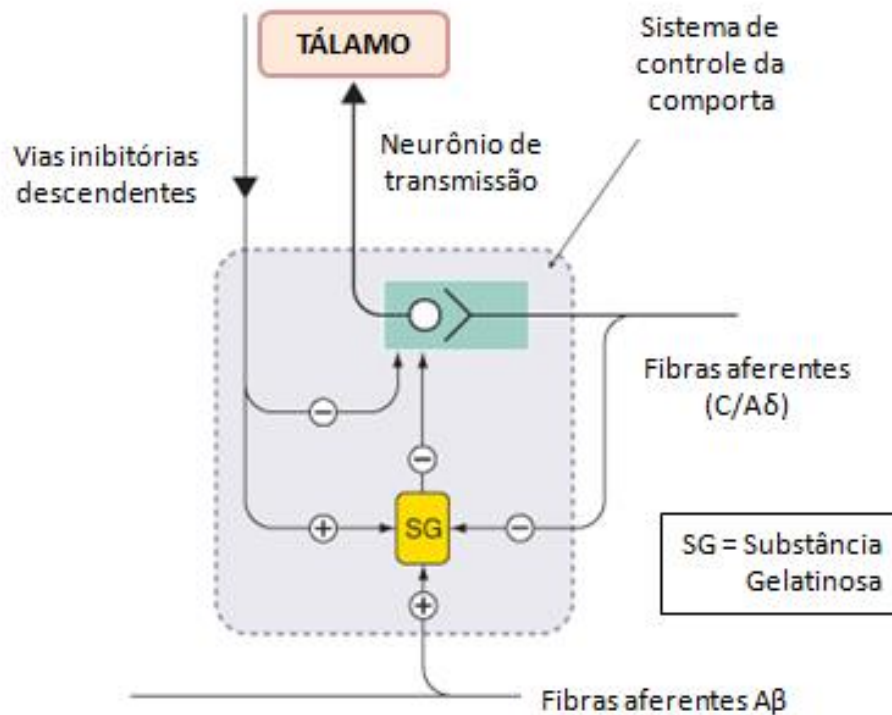


Figura 3. Teoria da comporta proposta por Melzack e Wall em 1965 (Fonte: Adaptado de RANG et al., 2007).

A teoria do portão também foi importante para que fatores psicológicos, que antes eram descartados como uma “reação à dor”, passassem a ser considerados como parte integrante do processo doloroso, o que abriu novas perspectivas para o controle da dor (FLEMING; GONÇALVES, 2009).

As vias descendentes podem modular a nocicepção interagindo com vários elementos neuronais: terminais das fibras aferentes primária, neurônios de projeção, interneurônios excitatórios e inibitórios, e terminais de outras vias ascendentes. É importante mencionar que os neurônios de projeção e os interneurônios específicos para a nocicepção, estão predominantemente localizados na lâmina superficial, respondendo

apenas a estímulos dolorosos, enquanto outros, principalmente na lâmina profunda, são excitados apenas por estímulos inócuos (MILLAN, 2002).

As vias descendentes originadas de estruturas cerebrais como área cinzenta periaquedutal, hipotálamo, formação reticular, locus ceruleus e núcleos bulbares da rafe, tem um importante papel na modulação e integração das mensagens nociceptivas no corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 1999). A modulação da dor através das vias descendentes inibitórias consiste na redução da liberação dos neurotransmissores excitatórios (glutamato, substância P e CGRP) a partir dos neurônios aferentes primários, por meio da liberação de neurotransmissores inibitórios a partir de interneurônios. Tais neurotransmissores inibitórios são principalmente o ácido γ -aminobutírico (GABA), noradrenalina e serotonina. Além disso, as endorfinas (opióides endógenos) também participam da antinocicepção (HARRIS; WESTBROOK, 1995; MALCANGIO; BOWERY, 1996; RIEDEL; NEECK, 2001).

2.2 INFLAMAÇÃO

O sistema imune, entre várias outras funções, desempenha um papel fundamental no reconhecimento rápido e eliminação de micro-organismos patogênicos, através de diferentes processos, tais como fagocitose e indução de inflamação (SKELDON; SALEH, 2011). A inflamação é classicamente definida como uma resposta fisiológica que pode ser desencadeada, dentre outros estímulos, pela invasão microbiana e/ou agressão tecidual, fundamental para o retorno à homeostasia. Tem por finalidade combater os agentes nocivos (de natureza infecciosa ou não), além de potencializar o reparo tecidual (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; FLOWER; PERRETTI, 2005; MEDZHITOV, 2008).

O processo inflamatório faz parte do processo de sobrevivência dos organismos contra as injúrias decorrentes de infecções e traumas. Em geral, a resposta inflamatória tem como resultado o reestabelecimento da integridade orgânica contra as agressões, entretanto, pode ocorrer uma resposta exacerbada provocando aumento de morbidade e mortalidade em doenças como artrite reumatoide, diabetes, esclerose múltipla e aterosclerose com isquemia cerebral e miocárdica (TRACEY, 2002).

A resposta inflamatória consiste na liberação sequencial de mediadores e recrutamento de leucócitos circulantes que são ativados no local da inflamação, liberando mediadores adicionais. No entanto, em muitos casos, a resposta inflamatória é resolvida pela liberação de mediadores anti-inflamatórios endógenos (citocinas anti-inflamatórias) bem como pela acumulação de fatores regulatórios negativos intracelulares. Contudo, a acumulação e ativação persistente de leucócitos são uma marca registrada da inflamação crônica, sugerindo uma disfunção destes mecanismos regulatórios negativos. (HANADA; YOSHIMURA, 2002).

O processo inflamatório envolve uma cascata de eventos bioquímicos e celulares, resultando em sinais clínicos característicos como rubor, calor, edema, dor acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (CARVALHO; LEMÔNICA, 2008; SERHAN, 2010). Os eventos iniciam-se com a liberação de substâncias quimiotáticas e aminas vasoativas como a serotonina e a histamina liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a agressão, provocando uma vasodilatação e, conseqüentemente, um aumento de fluxo sanguíneo na área afetada. Por conseguinte, há um aumento na permeabilidade vascular decorrente da contração do citoesqueleto das células endoteliais resultando na movimentação de proteínas e leucócitos do sangue para o tecido extravascular (CARVALHO; LEMÔNICA, 2008).

O processo inflamatório é comumente dividido em dois estágios, a fase aguda, mais precoce, e a fase crônica. A fase aguda é um estágio inicial da inflamação onde ocorrem alterações na microvasculatura, infiltração de neutrófilos seguida por monócitos que se diferenciam em macrófagos e finalmente os fibroblastos que se proliferam podendo restabelecer a estrutura do tecido lesado. Este tipo de inflamação persiste apenas por um curto período de tempo e é normalmente benéfica para o hospedeiro, capaz de erradicar o estímulo inicial (POBER; SESSA, 2007; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). A inflamação crônica é um evento de maior duração e está associada, histologicamente à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Durante o processo inflamatório agudo, muitos mediadores como óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, por exemplo, prostaglandina I₂ (PGI₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) promovem principalmente vasodilatação, acompanhado pelo calor e rubor característicos da reação inflamatória (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outro sinal precoce da inflamação aguda é a formação do edema, que ocorre devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas, dos compartimentos intravasculares para o interstício, devido ao aumento da permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, leucotrienos, fatores do complemento, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamatório (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Na fase aguda da resposta inflamatória, ocorre também a liberação de vários mediadores em especial componentes do sistema complemento, a exemplo dos fragmentos C3a e C5a, leucotrienos, quimiocinas (como a interleucina 8, IL-8) e ainda bioprodutos bacterianos como peptídeos N-formilados, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas para o foco inflamatório (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004; ADEREM; SMITH, 2004).

O endotélio ativado permite o extravasamento seletivo de células, a exemplo de neutrófilos e macrófagos. Essa seletividade é promovida pela ligação dessas células ao endotélio, através da expressão de selectinas e integrinas e receptores de quimiocinas, bem como da formação de espaços extravasculares (MEDZHITOV, 2008). As selectinas são moléculas de adesão que realizam as ligações entre leucócitos (L-selectinas) e endotélio (P- e E-selectinas). Apesar de forte, essa ligação é de curta duração o que faz a célula se ligar a próxima selectina, causando um fenômeno chamado de rolamento (LAWRENCE; SPRINGER, 1991). As integrinas e as imunoglobulinas, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), medeiam à adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, sendo importantes no processo da diapedese (SANDBORN; YEDNOCK, 2003; MILES et al., 2008).

Assim, no início do processo destacam-se as selectinas, dentre elas a P-selectina, que participa apenas no rolamento, enquanto a E-selectina participa tanto no rolamento quanto na adesão de leucócitos ao endotélio. Em seguida, o processo caminha para a forte adesão quando participam as integrinas nos leucócitos e as imunoglobulinas nas células endoteliais. As integrinas são proteínas transmembrana da superfície celular que reagem a sinais de ativação celular e se ligam a imunoglobulinas e à matriz extracelular. As imunoglobulinas são expressas nas células endoteliais como receptores para as integrinas leucocitárias. A VCAM-1 e a ICAM-1 são os principais receptores para as β 2-integrinas dos leucócitos. Após a forte adesão ao endotélio, os leucócitos migram através de junções interendoteliais (diapedese) e se dirigem aos sítios de inflamação

guiados pelos fatores quimiotáticos (MITCHELL et al. 2006; BEVILACQUA; NELSON, 1993; STEWART; THIEL; HOGG, 1995) (Figura 4).

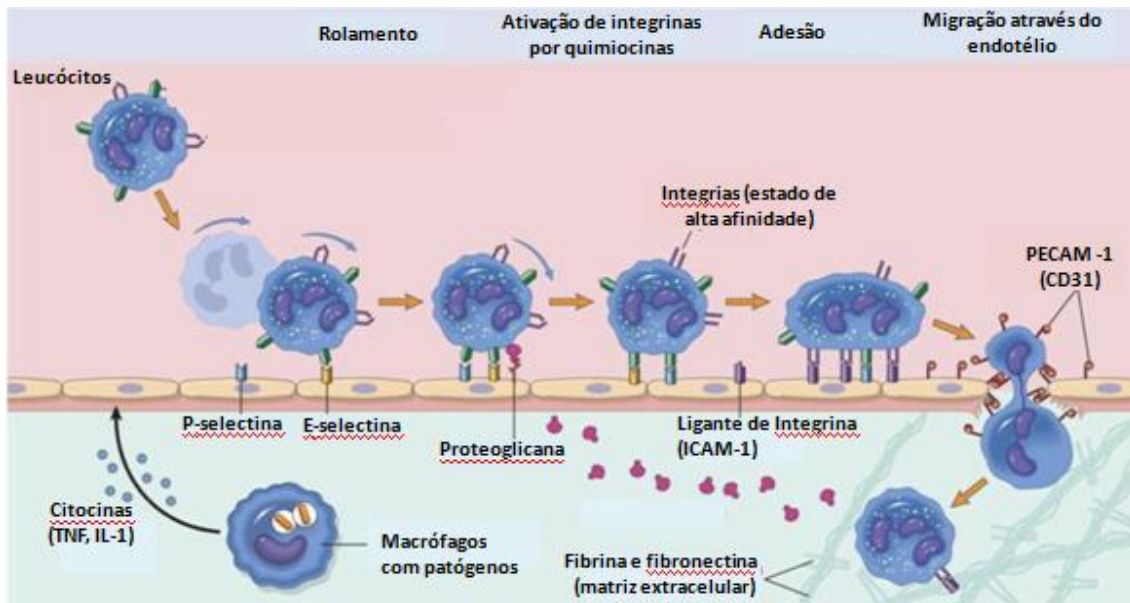


Figura 4. Processo de migração dos leucócitos (Fonte: <http://www.studyblue.com/notes/note/n/case-2/deck/2532289>. Acesso em: 01/2013).

Há dois tipos de células participantes do processo inflamatório agudo: as que estão permanentes nos tecidos, mastócitos e células endoteliais, e as que migram para o local afetado, tais como neutrófilos, macrófagos monócitos, eosinófilos e linfócitos nos quais produzem grande quantidade de moléculas ativas como as citocinas (SIMON; GREEN, 2005; SCHMID-SCHONBEIN, 2006; GÓMEZ ESTRADA; GONZÁLEZ RUIZ; MEDINA, 2011).

As citocinas são um grupo de substâncias mensageiras multifuncionais que transportam a informação de uma célula para outra, responsáveis pela indução de várias enzimas, tais como óxido nítrico sintase (NOS) e a ciclooxygenase 2 (COX-2). Elas podem ser anti-inflamatórias, por exemplo, a interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) que modulam negativamente os eventos inflamatórios (GRISHAM; JOURD'HEUILL; WINK, 1999; SZEKANECZ et al., 2006).

O TNF- α e IL-1 β estimulam células endoteliais próximas do local da inflamação a expressar moléculas de adesão tais como ICAM-1 e selectinas que se ligam à componentes da superfície das células fagocitárias provocando a aderência dos

fagócitos ao endotélio (MAY; WHEELER-JONES; PEARSON, 1996; MCHALE et al., 1999; NAVARRO-GONZALEZ et al., 2011). Os vasodilatadores produzidos no local da inflamação provocam o afrouxamento das junções entre as células endoteliais e os fagócitos então atravessam a barreira endotelial comprimindo-se entre as células endoteliais via um processo chamado de diapedese ou transmigração. Uma vez formados os espaços no tecido, quimiocinas atraem fagócitos ao local inflamado por quimiotaxia (movimento em direção a um gradiente químico) (LEY et al., 2007).

A progressão da resposta tecidual para inflamação crônica caracteriza-se por infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Os processos inflamatórios crônicos são de duração prolongada estendendo-se de semanas a meses. Durante a inflamação crônica ocorrem simultaneamente: a presença de processo inflamatório ativo, tentativas de reparo tecidual com conseqüente destruição do tecido e formação de fibrose. Entre as doenças crônicas inflamatórias incluem-se desordens como artrite reumatóide, aterosclerose e lupus eritematoso sistêmico (GILROY et al., 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A injúria tecidual que resulta na liberação de neuromediadores inflamatórios (prostaglandinas, bradicinina, adenosina trifosfato-ATP, prótons e fator de crescimento do nervo-NGF) que, quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, ativam os nociceptores (fibras nervosas tipos A δ e C) que transmitem a informação para o corno dorsal da medula espinhal e, depois para os centros superiores cerebrais onde a dor é interpretada. A transdução do sinal é aumentada ou sensibilizada por esses estímulos, pois os nociceptores possuem receptores de superfícies capazes de reconhecer os agentes pró-inflamatórios, que, ao serem ativados, desencadeiam um aumento na excitabilidade da fibra nervosa. As células envolvidas no processo inflamatório também liberam uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas, criando um estresse oxidativo, causando danos às estruturas celulares como lipídios, proteínas e DNA (HUANG; ZHANG; MCNAUGHTON, 2006; KRAYCHETE; VALENTE; CALASANS, 2006; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

As lesões que se iniciam no sistema nervoso periférico (SNP) modificam a anatomia e a fisiologia do SNC com hiperatividade celular que é predominante nas lâminas I, II e V do corno dorsal da medula espinhal, no tálamo e no córtex cerebral. Isso pode se manter por um longo período ou indefinidamente, justificando o caráter crônico da dor. Dessa forma, pode-se observar que o SNC e o sistema imune estão

funcionalmente conectados e integrados (BENNETT, 2000; STADNYK; GAULDIE, 1991).

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE MALVACEAE E *Herissantia crispa*

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas pertencentes à família Malvaceae, uma vez que, uma grande variedade de compostos naturais tem sido encontrada em espécies desta família com propriedades farmacológicas comprovadas.

A família Malvaceae é constituída por 243 gêneros e 4225 espécies (STEVENS, 2003). Membros desta família ocorrem em quase todas as partes do mundo, com exceção de regiões muito frias, e são particularmente abundantes nas regiões tropicais, principalmente na América do Sul (HEYWOOD, 1993). Barroso e colaboradores (1991) mencionaram a ocorrência de 35 gêneros e 400 espécies no Brasil.

Em geral, as espécies da família Malvaceae são plantas que se apresentam como ervas, arbustos e árvores, com folhas inteiras ou profundamente lobadas ou partidas; flores grandes e vistosas, hermafroditas e com o desenvolvimento de cálice externo (JOLY, 2002).

Estudos químicos sobre os metabólitos secundários das Malvaceae descreveram a ocorrência de triterpenos (AHMED; KAZMI; MALIK, 1990), flavonóides (SILVA et al., 2005, 2005a), óleos essenciais (AMES; MACLEOD, 1990), lactonas sesquiterpênicas (SHARMA; AHMAD, 1989) e ácidos graxos (CARMODY; DEJONG; SMITH, 1945; VICKERY, 1980; SCHIMID; PATTERSON, 1988; NAKATANI; FUKUNAGA; HASE, 1986).

Há muitos relatos na literatura relacionados ao uso de várias espécies da família Malvaceae na medicina tradicional. Alguns destes usos incluem a utilização como emolientes, antifebris, anti-inflamatório (AHMED; KAZMI; MALIK, 1990), diuréticos, no tratamento de reumatismos, desordens gastrointestinais (AHMED; KAZMI; MALIK, 1990; SHULTZ, 1968; YESILADA; GÜRBÜZ, 2002), picadas de cobra (OTERO et al., 2000) e asma (FRANZOTTI et al, 2000).

Estudos farmacológicos em modelos animais utilizando extratos de *Sida cordifolia* e *Sida rhomboidea*, espécies pertencentes à família Malvaceae, indicaram

atividade antinociceptiva e anti-inflamatória comprovando sua utilização popular. (VENKATESH et al., 1999; FRANZOTTI et al., 2000; ALAM et al., 1991; SUTRADHAR et al., 2006). Segundo estudos realizados por Sezik e colaboradores (1997) a *Malva neglecta*, também pertencente à família Malvaceae, apresenta efeito antinociceptivo.

Herissantia é gênero da família Malvaceae que apresenta poucos estudos quanto à suas propriedades químicas e farmacológicas. É um gênero com distribuição neotropical, possui hábito subarbustivo e arbustivo, difuso e escandente, fruto pendular e inflado, com mericarpos reniformes e escariosos (FRYXELL, 1973). É constituído por seis ou mais espécies restritas a América tropical (FRYXELL, 1997). A maioria das espécies ocorre no México, Antilhas e América do Sul. Somente *Herissantia crispa* é de ampla distribuição, ocorrendo desde os Estados Unidos até a Argentina (FRYXELL, 1993).

O gênero *Herissantia* possui diversos tipos de fitoconstituintes, como ácidos graxos, triterpenos, esteróides, ácidos fenólicos, flavonóides na forma de aglicona ou glicosilados (SILVA et al., 2005b). Foram isolados da espécie *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky quatro triterpenos (frideline, lupeol, cicloartenol e cicloeucalenol), um esteróide (β -sitosterol) e cinco compostos fenólicos (ácido p-metoxibenzoico, 6,7-dimetoxycoumarina e três flavonóides glicosilados, canferol 7-O- α -L-ramnopiranosídeo, 3-O- β -D-(6''-E-p-cumaroil) glicosídeo, 4',5-diidroxi-3,6,7,8,3'-pentametoxiflavona) (SILVA et al., 2005; 2005a; SILVA et al., 2009). Cicloeucalenol e cicloartenol mostraram um efeito relaxante no íleo de cobaia (GOMES et al., 2005). O flavonóide 4',5-diidroxi-3,6,7,8,3'-pentametoxiflavona desempenhou um papel relevante na modulação da resistência bacteriana a alguns antibióticos (SILVA et al., 2009). Os estudos preliminares realizados com o flavonóide lespedina revelaram uma atividade relaxante sobre a artéria mesentérica superior, o que poderia ser considerado como um resultado importante no sistema cardiovascular (SILVA et al., 2005a).

A espécie vegetal *Herissantia crispa* (L.) Brizicky (Figura 5) é conhecida popularmente como malvaíscio (JOHANN et al., 2007; AGRA et al., 2008). Estudos realizados em nosso laboratório com o extrato etanólico de *H. crispa* mostraram que esta espécie não apresentou toxicidade em nível de SNC nas doses e condições avaliadas segundo os protocolos citados por Almeida e colaboradores (1999), não sendo possível determinar a DL₅₀ do extrato, pois, o mesmo não provocou a morte dos animais no tempo de 72 horas. O extrato etanólico de *H. crispa* apresentou características de

drogas com perfil sedativo-hipnótico e atividade antinociceptiva central, na qual não foi observada participação do sistema opióide (PEREIRA, 2009; PEREIRA et al., 2012).

Segundo Lima (2008), a espécie *H. crispa* apresentou ação antiulcerogênica, provavelmente relacionada ao mecanismo de citoproteção, com alguns indícios de mecanismos anti-secretórios e antioxidantes, havendo a necessidade de estudos complementares para confirmação desses mecanismos. Além disso, uma série de experimentos determinaram que a espécie possui atividade antidiarreica, antiulcerogênica e antimicrobiana (LIMA et al., 2009).

Existe ainda a indicação etnomedicinal do uso de raízes e flores de *H. crispa* no tratamento de infecções do trato respiratório e tosse (BOVINI; OKANO-CARVALHO; VIEIRA, 2001; AGRA et al., 2008), efeitos estes ainda não evidenciados por estudos científicos.



Figura 5. Partes aéreas de *H. crispa* L. (Brizicky) (Foto: J. F. Tavares, 2005).

O estudo fitoquímico de *H. crispa* resultou no isolamento de sete constituintes químicos, sendo: três esteróides (β -sitosterol, sitosterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo e estigmasterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo) e quatro flavonóides: 3,5,7,4'-tetraidroxiflavonol (canferol); 3,5,7,3',4'-pentaidroxilflavonol (quercetina); canferol 3-O- β -D-glicopiranosídeo (tilirosídeo) e o canferol 3,7-di-O- α -L-raminopiranosídeo

(lespedina) (Figura 6) (COSTA et al., 2009), sendo o tilirosídeo e a lespedina marcadores químicos desta espécie (MATIAS, 2009).

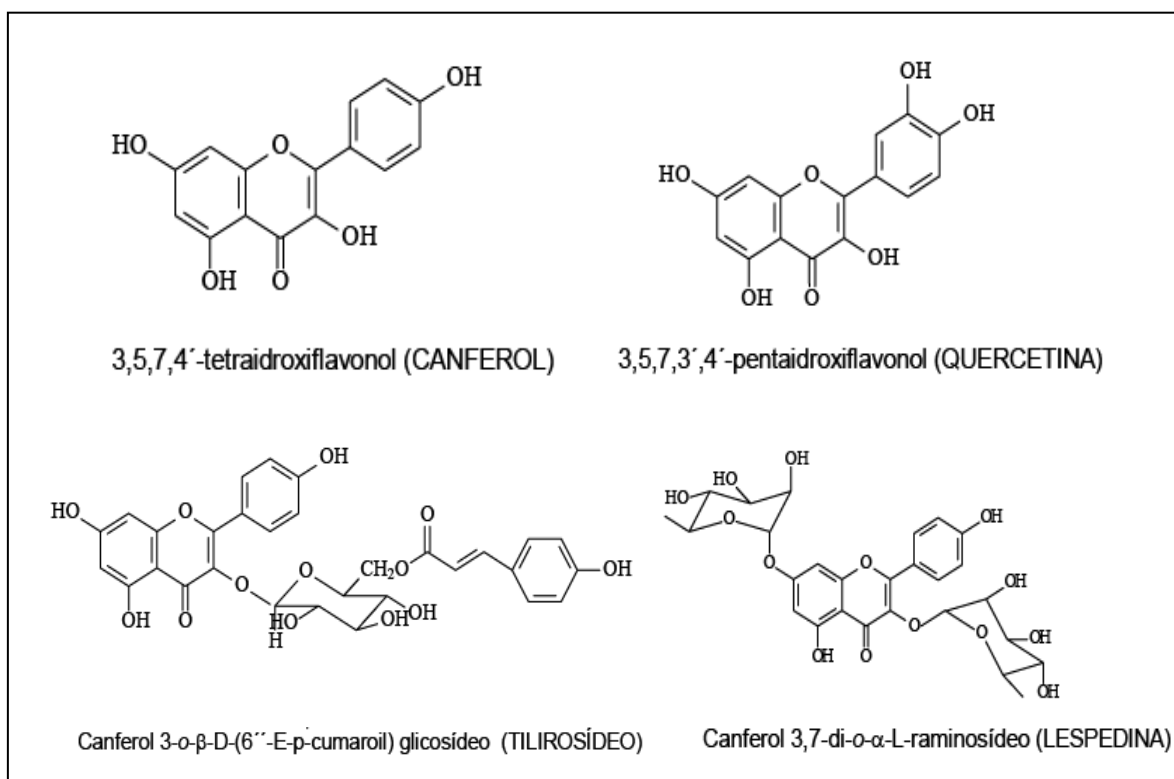


Figura 6. Flavonóides isolados da *H. crispa* (Fonte: COSTA, 2009).

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (SIMÕES et al., 1986). Um amplo número de atividades farmacológicas tem sido atribuído a este grupo de metabólitos secundários. Dentre várias delas cabe destacar as suas propriedades diuréticas (WANG, 2000), antiespasmódicas (MUROTA, TERRÃO, 2003), antibacterianas (PLAPER et al., 2003), antiulcerativas (FRANCESCA; ANGELO, 2000), antivirais (CHIANG et al., 2003), antifibrótica (QI et al., 2001), antineoplásicas (LOPEZ-LAZARO, 2002), estrogênicas, antioxidantes (BOADI; IYERE; ADUNHYA, 2003), anti-inflamatórias (THEOHRIDES et al., 2001) e outras (WANG, 2000).

A quercetina é um flavonóide que produz significativa resposta antioxidante (HUK et al., 1998; PERES et al., 2000; JONAVIC et al., 1998) antitumoral (HERTOG et al., 1994; LIN et al., 2002; KANEUCHI et al., 2003), efeito gastoprotetor

(KAHRAMAN et al., 2003), entre outros (LIESVELD et al., 2003; LIMA et al., 2001; MILTERSTEINER et al., 2003).

Além destes efeitos, a quercetina também apresentou ação anti-inflamatória, antinociceptiva quando testada com ácido acético, formalina e capsaicina (CARLIXTO et al., 2000; WILLAIN-FILHO, 2005). No estudo realizado por Ryłski e colaboradores (1979) o efeito analgésico de vários flavonóides dentre os quais, a quercetina, figurava como o mais efetivo quando avaliado no teste da placa quente.

Estudos sobre o tilirosídeo já relataram atividade citotóxica em linhagens de células leucêmicas (DIMAS et al., 2000), atividade hepatoprotetora (MATSUDA et al., 2002) e ação como anti-hipertensiva, por produzir efeito vasorelaxante (SILVA et al., 2005b). Também foi observado que esta substância produziu um efeito relaxante em músculo liso de íleo de cobaia provocado pelo tilirosídeo, sendo esta ação mediada, possivelmente, pelo bloqueio do influxo de cálcio (COSTA et al., 2007).

O tilirosídeo apresenta atividade anti-inflamatória significativa, além de atividade antioxidante, atuando através de um mecanismo de varredura de radicais peróxidos, e sugerindo assim uma possível relação entre o efeito anti-inflamatório e o antioxidante (SALA et al., 2003).

A lespedina (canferol 3,7-*O*- α -L-raminopiranosídeo) também foi efetivo como agente hipoglicemiante, com ação no tecido alvo da insulina, mostrando uma ação insulino-mimética na captação de glicose sem, no entanto, alterar a síntese protéica, em ratos diabéticos (JORGE, 2003).

A *H. crispa* foi inicialmente selecionada para estudo durante o mestrado, por ser rica em flavonóides e por estes constituintes químicos apresentarem atividades biológicas anteriormente comprovadas em outros trabalhos científicos. Os resultados obtidos em nosso laboratório resultaram em uma dissertação com o extrato etanólico de *H. crispa*, onde constatamos uma atividade antinociceptiva, que nos estimulou a dar continuidade, investigando o mecanismo de ação desse efeito, e também, uma possível atividade anti-inflamatória. A hipótese de que a espécie teria uma atividade anti-inflamatória foi postulada porque o extrato etanólico de *H. crispa* foi mais efetivo em reduzir o tempo de lambida da pata dos animais na segunda fase do teste da formalina quando comparada com a primeira fase.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Herissantia crispa* (L.) Brizicky e os possíveis mecanismos de ação envolvidos nestas atividades, contribuindo para ampliar o conhecimento das atividades farmacológicas desta planta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antinociceptiva da fase hidroalcoólica da *H. crispa* (FHAHc), da fase acetato de etila da *H. crispa* (FAEHc) e dos flavonóides lespedina e tilirosídeo, isolados desta fase;
- Investigar a participação dos sistemas opióide, adenosinérgico, muscarínico, oxidonitrérgico, adrenérgico e dos canais para potássio sensíveis à ATP na antinocicepção causada pela FAEHc no teste da formalina;
- Analisar a atividade anti-inflamatória da FAEHc no edema de pata induzido por carragenina;
- Evidenciar a migração de células inflamatórias, assim como os níveis das citocinas TNF- α e IL- β no lavado peritoneal dos animais tratados com a FAEHc no modelo da peritonite induzida por carragenina.

Material e Métodos



4 MATERIAL

4.1 PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO, FASES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

As fases (acetato de etila e hidroalcoólica) e as substâncias isoladas (tilirosídeo e lespedina) da *H. crispa* foram fornecidos pela Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza (Laboratórios de Fitoquímica e Síntese Orgânica do PPgPNSB /UFPB).

O extrato etanólico de *H. crispa* foi obtido das partes aéreas do vegetal após secagem em estufa de ar circulante à 40°C e pulverização; onde o pó seco da planta foi submetido à maceração em etanol a 95% por 72 horas e o líquido extrator foi concentrado sob pressão reduzida a 60°C em rotaevaporador, fornecendo o extrato etanólico.

Posteriormente, para obtenção das fases, o extrato etanólico foi solubilizado em etanol:água (7:3). A solução hidroalcoólica obtida foi particionada com hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, respectivamente, seguindo um gradiente crescente de polaridade. Após a evaporação do solvente de todas as fases em rotaevaporador obteve-se as fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e fase n-butanólica, por fim a fase remanescente foi denominada de hidroalcoólica. No entanto, para a realização dos testes, foram utilizadas as fases acetato de etila e hidroalcoólica.

Uma parte da fase acetato de etila, que não foi concentrada, foi submetida à cromatografia em sephadex LH-20, utilizando metanol como eluente e após reunião das frações obtidas através de análise em Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), passaram por análise espectral de RMN ¹H e ¹³C, resultando na identificação dos flavonóides: canferol 3-O-β-D-(6''-E-p-cumaroil) glicosídeo (tilirosídeo) e canferol 3,7-di-O-α-L-raminopiranosídeo (lespedina).

Durante os experimentos, as fases e as substâncias isoladas de *H. crispa*, obtidas de acordo com o procedimento anteriormente descrito, foram solubilizadas em água destilada, e, quando necessário, adicionou-se cremofor (0,2 %), no intuito de facilitar a solubilização. Todas as substâncias foram preparadas imediatamente antes de cada experimento, utilizando-se concentrações decimais de forma a possibilitar a administração de 0,1 mL/10 g de peso do animal. As doses utilizadas na diluição das fases foram 250, 500 e 750 mg/kg de peso animal e as substâncias isoladas nas doses de

25 e 50 mg/kg de peso animal. A via de administração escolhida foi a via intraperitoneal (i.p.). A determinação das doses utilizadas teve como base o estudo realizado anteriormente com o extrato etanólico de *Herissantia crispa* (i.p.) durante o trabalho mestrado (PEREIRA, 2009). O grupo controle foi tratado com o veículo.

4.2 ANIMAIS

No estudo foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* (Figura 7), machos, albinos com peso variando entre 25 - 35 g, com aproximadamente três meses de idade, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, sob condições monitoradas de temperatura (21 ± 2 °C), com livre acesso a uma dieta à base de ração tipo pellets (Purina®) e água, disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00 às 18h00.



Figura 7. Camundongo *Swiss*.

4.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de Psicofarmacologia Prof. Elizaldo A. Carlini ou na sala 03 (Setor de Experimentação Comportamental) do

Biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no período compreendido entre as 12h00 e às 17h00 horas.

Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, contendo 04 animais cada, por um período de pelo menos 60 minutos de antecedência à execução dos testes e sendo privados de água e ração, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais bem como permitir uma adaptação ao novo ambiente. Os animais foram utilizados uma única vez.

Antes de cada procedimento as bancadas e os aparelhos utilizados foram higienizados com álcool à 70%, entretanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixa graduação (10%), na tentativa de diminuir possíveis odores que pudessem interferir no comportamento dos animais.

Os procedimentos experimentais utilizados durante o trabalho foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da UFPB, sob a certidão de nº 0106/10 (Anexo).

4.4 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- Ácido glutâmico (Sigma – EUA)
- Cafeína (Sigma – EUA)
- Carragenina (Sigma – EUA)
- Cloreto de sódio (Merck – EUA.)
- Cloridrato de morfina (Merck – EUA.)
- Cremofor (Sigma – EUA)
- Dexametasona (Aché – Brasil)
- Etanol (LTF / UFPB – Brasil)
- Formaldeído 37% (Vetec – Brasil)
- Glibenclamida (Sigma – EUA)
- Hidrocloridrato de ioimbina (Sigma – EUA)
- Hidrocloridrato de naloxona (Research Biochemical – EUA)
- Kit para dosagem de TNF- α (eBioscience – E.U.A);
- Kit para dosagem de IL-1 β (eBioscience – E.U.A);
- L-arginina (Sigma – EUA)

- MK-801 (Sigma – EUA)
- N^o – nitro – L – arginina (Sigma – EUA)
- Solução tampão fosfato (Sigma – EUA)
- Solução tampão *sheath fluid* (MiraiBio - Califórnia).
- Solução de Turk (Merck – Brasil)
- Sulfato de atropina (Sigma – EUA)

4.5 APARELHAGEM

- Caixa de observação para o teste da formalina
- Citocentrífuga (Bio Research – E.U.A)
- Leitor de microplaca ELISA (Titertek Multiskan Reader – E.U.A)
- Micrômetro digital (Great – Brasil)
- Microscópio óptico (Olympus – Japão)

4.6 OUTROS MATERIAIS

- Câmara de Neubauer
- Placas de Elisa

5 MÉTODOS

O delineamento experimental para avaliação da atividade antinociceptica e anti-inflamatória da espécie *H. crispa*, em camundongos, estão esquematizados na Figura 8:

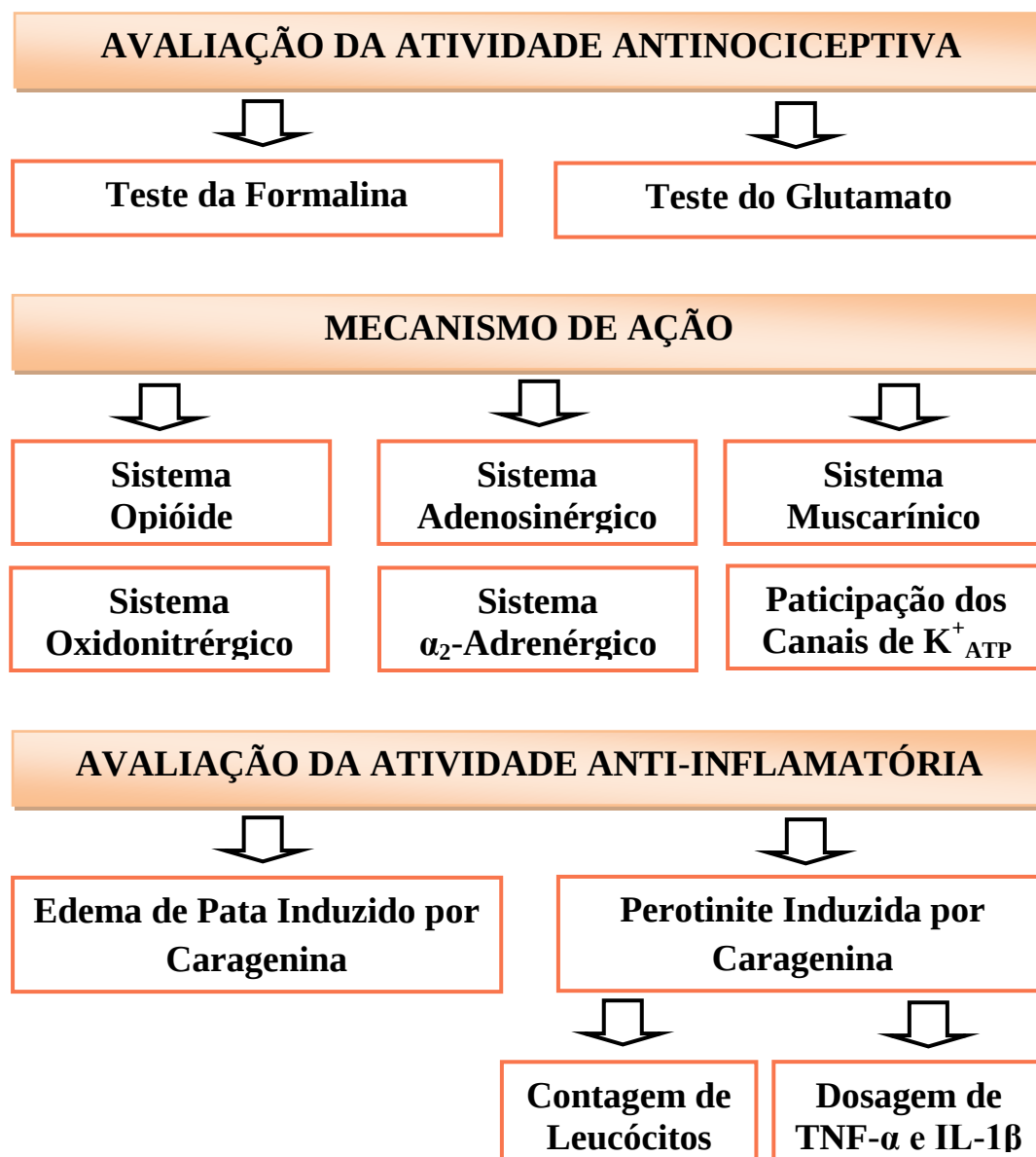


Figura 8. Resumo esquemático do estudo da atividade antinociceptica e anti-inflamatória da espécie *H. crispa* em camundongos.

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

5.1.1 TESTE DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

O teste da formalina foi realizado como descrito por Vaz et al. (1996) que é uma modificação do modelo inicialmente descrito por Hunskaar e Hole (1987), essa metodologia consiste na administração intraplantar de 20µL de uma solução de formalina na pata direita do animal. Após a injeção da formalina, os camundongos foram colocados em um aparato triangular composto por duas paredes espelhadas e uma de vidro transparente, facilitando a visualização do animal, para que seja cronometrado o tempo de lambida da pata em duas fases (SHIBATA et al., 1989). A primeira fase (0-5 min) ocorre imediatamente após a administração da formalina, provocando uma resposta nociceptiva decorrente da estimulação química direta dos nociceptores e liberação de aminoácidos excitatórios (TJOLSEN et al., 1992); a inibição dessa fase é indicativa de drogas analgésicas que atuam em nível central (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Depois, há um período chamado de interfase (5-15 min), que é caracterizado pelos mecanismos endógenos de supressão da dor (HENRY et al., 1999; GAUMOND; SPOONER; MARCHAND, 2007). A segunda fase (15-30 min) é conhecida por um processo inflamatório, levando a liberação de mediadores como a serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandina (PARADA et al., 2001).

Para realização deste experimento, os animais dos grupos experimentais receberam um dos tratamentos: FAEHc (250, 500 ou 750 mg/kg, i.p.), FHAHc (750 mg/kg, i.p.), tilirosídeo (25 ou 50 mg/kg, i.p.) ou lespedina (25 ou 50 mg/kg, i.p.). O grupo controle foi tratado com veículo e o grupo padrão foi tratado com morfina (10 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos, 20 µL de solução de formalina 2,5% foram injetadas na região intraplantar da pata posterior direita dos camundongos e em seguida esses animais foram colocados nas caixas de observação, sendo então registrado o tempo total de lambida da pata que recebeu a formalina durante as duas fases do teste.

5.1.2 TESTE DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO GLUTAMATO

Este modelo foi proposto por Beirith e colaboradores (1998; 2002) e proporciona o estudo de drogas que atuam sobre o sistema glutamatérgico envolvido na transmissão nociceptiva. A injeção de glutamato induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa (BEIRITH; SANTOS; CARLIXTO, 2002). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação da FAEHc com o sistema glutamatérgico.

Para realização deste experimento, os animais foram tratados com a FAEHc (250, 500 ou 750 mg/kg, i.p.), com o antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.), ou com o veículo. Trinta minutos após, foi administrado 20 µL de glutamato na dose de 20 µmol/pata na região intraplantar da pata posterior direita do animal e, em seguida, foram colocados na caixa de observação para cronometrar o tempo de lambida da pata durante quinze minutos.

5.1.3 AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE *Herissantia crispera*

Com o objetivo de esclarecer os possíveis mecanismos de ação envolvidos na antinocicepção induzida pela *Herissantia crispera*, utilizaram-se agonistas e antagonistas em doses já estudadas na literatura. Estes estudos basearam-se na utilização de ferramentas farmacológicas que atuam especificamente em receptores envolvidos com a transmissão da dor (VIDYALAKSHMI et al., 2010; KHALID et al., 2011). Para realização desta investigação, foram escolhidos o teste da formalina e a FAEHc na dose de 750 mg/kg (i.p.), por ser a dose que demonstrou efeito mais evidente no modelo selecionado. As vias de neuromodulação escolhidas foram a opióide, a adenosinérgica, a muscarínica, a via L-arginina-óxido nítrico, a α_2 -adrenérgica e a via dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}).

5.1.3.1 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OPIÓIDE

A fim de avaliar a participação do sistema opióide sobre o efeito antinoceptivo da FAEHc, foi utilizado naloxona, um antagonista opióide não-seletivo (JIN et al., 2010). Administrou-se naloxona (5 mg/kg, s.c.) quinze minutos antes dos grupos serem tratados com a FAEHc (750 mg/kg, i.p.), com o veículo ou com o padrão morfina (10 mg/kg, i.p.). Um dos grupos foi tratado apenas com a FAEHc (750 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após estes tratamentos, os animais foram submetidos ao teste da formalina (TJOLSEN et al., 1992).

5.1.3.2 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ADENOSINÉRGICO

A cafeína, antagonista não-seletivo de receptores adenosina, foi utilizada, durante esta fase de experimentos, como ferramenta farmacológica para a determinação de um possível envolvimento do sistema de receptores adenosinérgicos no efeito antinociceptivo da FAEHc (ESSER; SAWYNOK, 2000). Todos os grupos foram pré-tratados com cafeína (10 mg/kg, i.p.) quinze minutos antes da administração da FAEHc (750 mg/kg, i.p.) ou veículo. Um dos grupos foi tratado apenas com a FAEHc (750 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos destes tratamentos, os animais foram submetidos ao teste da formalina.

5.1.3.3 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA MUSCARÍNICO

Com a finalidade de investigar a possível participação do sistema muscarínico no efeito antinociceptivo da FAEHc foi utilizada a atropina, um antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos (PEANA et al., 2003). Os animais de cada grupo foram pré-tratados com atropina (5 mg/kg, i.p.) quinze minutos antes da administração da FAEHc (750 mg/kg, i.p.) ou veículo. Apenas um grupo não recebeu esse pré-tratamento e foi administrado a FAEHc (750 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos destes tratamentos, os animais foram submetidos ao teste da formalina.

5.1.3.4 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OXIDONITRÉRGICO

Para avaliar a participação da via da L - arginina - óxido nítrico no efeito antinociceptivo induzido pela FAEHc, os animais foram previamente tratados com o precursor do NO, a L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e após quinze minutos receberam a FAEHc (750 mg/kg, i.p.), N^o – nitro – L - arginina (L-NOARG, 50 mg/kg, i.p.) um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, ou o veículo (BEIRITH et al., 1998). Um dos grupos recebeu apenas a FAEHc (750 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos da administração da FAEHc, do L-NOARG e do veículo, os animais foram submetidos ao teste da formalina.

5.1.3.5 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA α_2 -ADRENÉRGICO

Com o objetivo de evidenciar a participação do sistema α_2 -adrenérgico sobre a atividade antinociceptiva da FAEHc, os grupos de animais foram tratados previamente com o antagonista dos adrenoreceptores α_2 , ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.), quinze minutos antes da administração da FAEHc (750 mg/kg, i.p.) ou do veículo. Um dos grupos foi tratado apenas com a FAEHc (750 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos da administração da FAEHc e do veículo, os animais foram submetidos ao teste da formalina (PEREIRA, 2005; DE SOUZA et al., 2009).

5.1.3.6 PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE K⁺_{ATP}

Com o objetivo de verificar o envolvimento dos canais de K⁺_{ATP} na atividade antinociceptiva da FAEHc, foi utilizada a glibenclamida, uma sulfoniluréia que bloqueia especificamente estes canais (OCANA et al., 2004; LOPES et al., 2012).

Os animais receberam um pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) quinze minutos antes da administração da FAEHc (750 mg/kg, i.p.) ou veículo. Um dos grupos foi tratado apenas com a FAEHc (750 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos destes

tratamentos foi verificado o tempo de lambida da pata nas duas fases do teste da formalina.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.2.1 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Para a realização desse experimento, os camundongos foram divididos randomicamente em grupos tratados com veículo, com a FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.). Antes do início do experimento, a espessura das patas traseiras, esquerda e direita, de cada animal foram medidas com o auxílio de um micrômetro digital, sendo a diferença entre elas considerada a medida basal.

Após trinta minutos (ou uma hora para os animais tratados com dexametasona) dos tratamentos, os animais receberam 20 μ L de uma solução de carragenina (1%) na região subplantar da pata posterior direita e 20 μ L de salina na pata posterior esquerda. A administração de 20 μ L de carragenina (1%) na região subplantar provoca uma inflamação aguda com consequente formação de edema e hiperalgesia (YESILADA; KUPELI, 2007). O grupo controle negativo recebeu apenas a solução salina nas duas patas.

A espessura da pata (mm) foi mensurada com o auxílio de um micrômetro digital nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 24, 48 e 72 horas depois da administração do estímulo nocivo. A variação da espessura da pata esquerda e direita de cada animal foi o parâmetro analisado neste experimento.

5.2.2 PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

Com a finalidade de avaliar a capacidade da FAEHc em inibir a migração celular após a administração de um estímulo inflamatório, utilizou-se o modelo da peritonite induzida por carragenina. A carragenina produz uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal dos camundongos (HALL et al., 1998)

Nesse propósito, os animais foram separados em grupos e tratados com veículo, FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.). Após trinta minutos dos tratamentos, administrou-se uma solução de carragenina (1%) por via intraperitoneal para indução da inflamação.

Quatro horas após a administração da carragenina, os animais foram eutanasiados, e 300 µL de uma solução tampão de fosfato de sódio (PBS) estéril gelado foram injetados na cavidade peritoneal. Cautelosamente, o peritônio foi massageado, e o lavado peritoneal foi puncionado e colocado em tubos tipo eppendorf, para que fossem centrifugados a 1500 rpm, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e armazenado a -20 °C, para posterior dosagem das citocinas TNF- α e IL-1 β .

As células presentes nos pellets foram novamente suspensas, e cada amostra foi diluída com a solução de Turk na proporção 1:10. Com a ajuda de uma pipeta automática, a amostra diluída foi colocada na Câmara de Neubauer e a contagem total dos leucócitos ocorreu em um microscópio óptico na objetiva de 40x.

Para a contagem diferencial de leucócitos, 100 µL da suspensão de células do lavado peritoneal, previamente diluídos 1:10, foram centrifugados em uma citocentrífuga a 1500 rpm por 15 minutos para obtenção das lâminas. As células foram coradas com a coloração de May-Gruanwald-Giemsa, e a contagem diferencial foi realizada com objetiva de imersão de 100X. A contagem diferencial foi realizada usando o padrão de critérios morfológicos para identificar os tipos de célula (SOUSA et al., 2010).

5.2.3 DOSAGEM DE CITOCINAS NO LAVADO PERITONEAL

As citocinas, TNF- α e IL-1 β , presentes no sobrenadante do lavado peritoneal foram quantificadas utilizando kit ELISA específico. A leitura das microplacas foi feita a 450nm, e a quantidade de citocinas foi calculada a partir da curva-padrão. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de ELISA de 96 poços (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-TNF- α e anti-IL-1 β , e incubadas durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, utilizou-se a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino) nos sítios inespecíficos por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de tween 20 e adicionou-se 50 µL das amostras e diferentes

concentrações das citocinas recombinantes. As placas foram novamente incubadas por uma noite a 4°C.

Em sequência, os poços foram lavados e uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE) foi adicionada aos poços da placa e então incubada por 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, adicionou-se a placa uma solução tampão sheath fluid (Luminex®). Em sequência, realizou-se a leitura em leitor de microplaca a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão e expressos como quantidade total por mililitro (pg/mL).

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o método de Análise de Variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Dunnet para comparação entre as médias, ou ainda utilizando-se o teste de Neuman-Keuls. Os dados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.), sendo os valores considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância (*p*) menor que 0,05.

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

A porcentagem de inibição foi determinada pela comparação entre as médias do grupo controle e experimental, calculadas pela seguinte fórmula (OYEMITAN et al., 2008; IJEOMA et al., 2011; TAHER, 2012).

$$\text{Porcentagem de inibição} = 100 - \frac{\text{média do grupo experimental}}{\text{média do grupo controle} \times 100}$$

Resultados



6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

6.1.1 EFEITO DAS FAEHc e FHAHc NO TESTE DA FORMALINA

Os resultados mostrados na Figura 9 evidenciam uma redução significativa no tempo de lambida da pata dos animais tratados com a FAEHc ($43,3 \pm 3,3$ s) e a FHAHc ($59,3 \pm 4,8$ s) na dose de 750 mg/kg, apresentando valores de inibição de 53,9% e 37,1%, em relação ao grupo controle ($94,3 \pm 6,1$ s). A morfina (10mg/kg) diminuiu o parâmetro analisado em 72,0% ($26,4 \pm 5,6$ s).

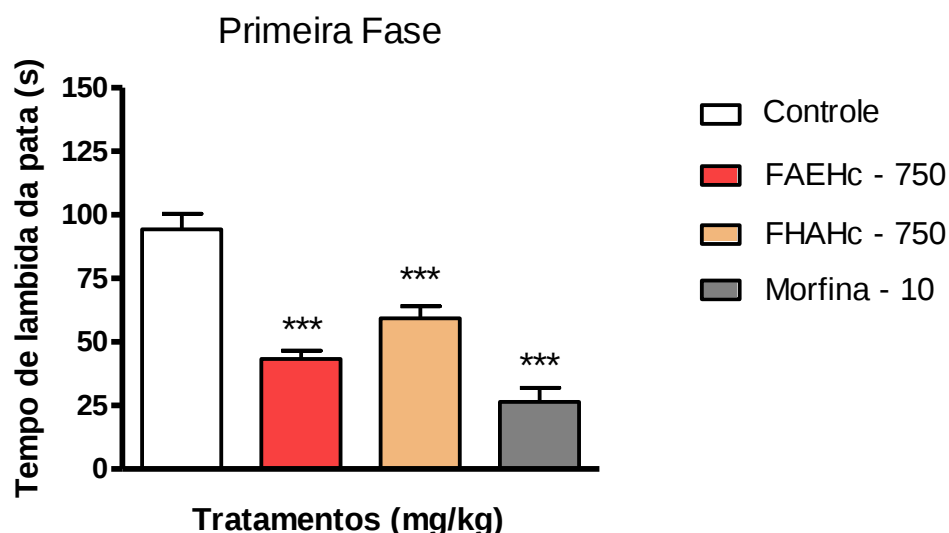


Figura 9. Efeito da FAEHc (750 mg/kg, i.p), FHAHc (750 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). ***p<0,001.

Conforme mostrado na Figura 10, a FAEHc ($10,0 \pm 6,6$ s) e a FHAHc ($37,6 \pm 15,4$ s), ambas na dose de 750 mg/kg também reduziram o tempo de resposta na segunda fase do teste da formalina, correspondendo a uma inibição de 95,5% e 83, 1%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($222,8 \pm 23,4$ s). O grupo tratado com a droga padrão, morfina, diminuiu o comportamento nociceptivo em 92,3% ($17,0 \pm 11,8$ s).

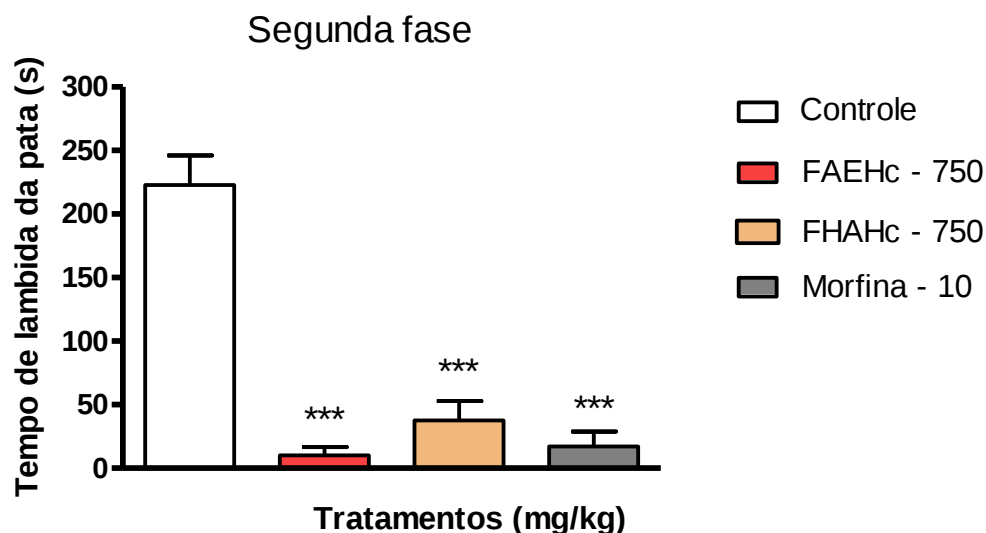


Figura 10. Efeito da FAEHc (750 mg/kg, i.p.), FHAHc (750 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). ***p<0,001.

Quando a FAEHc foi testada nas doses de 250, 500 e 750 mg/kg, os animais apresentaram uma diminuição significativa no tempo de lambida da pata nas duas fases do teste da formalina. Na primeira fase (Figura 11), a FAEHc apresentou redução do tempo de lambida da pata dose-dependente os seguintes valores de inibição, da menor dose para a maior dose, respectivamente, 49,8% ($45,4 \pm 5,6$ s), 64,2% ($32,4 \pm 5,7$ s) e 83,3% ($15,1 \pm 5,1$ s) em relação ao grupo controle ($90,5 \pm 4,5$ s). Na segunda fase (Figura 12), houve uma inibição no tempo de lambida da pata de 99,8% ($0,4 \pm 0,4$ s), 100% (0,0 s) e 100 (0,0 s), respectivamente, em relação ao controle ($297,1 \pm 30,4$ s). A morfina apresentou uma inibição de 73% ($24,4 \pm 4,3$ s) e 100% (0,0 s), na primeira e segunda fase, respectivamente.

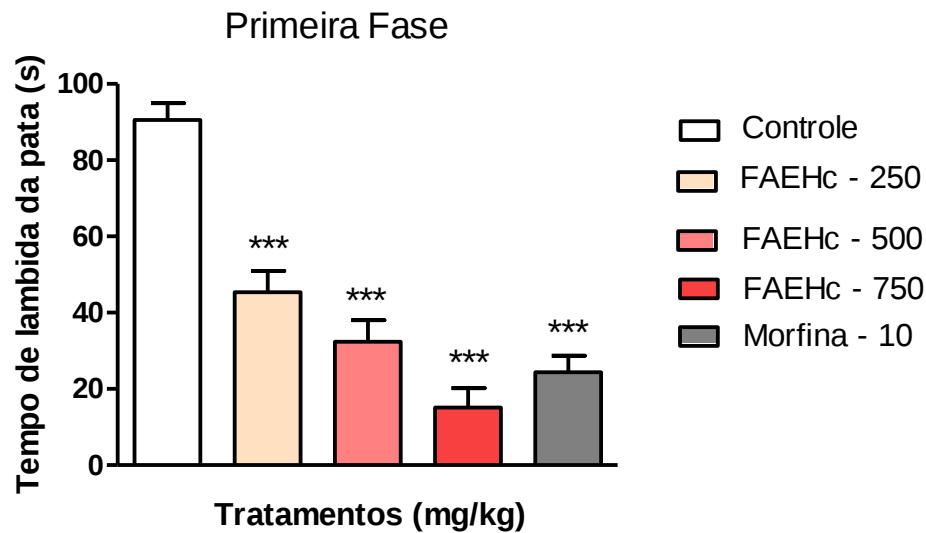


Figura 11. Efeito da FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). ***p<0,001 versus controle

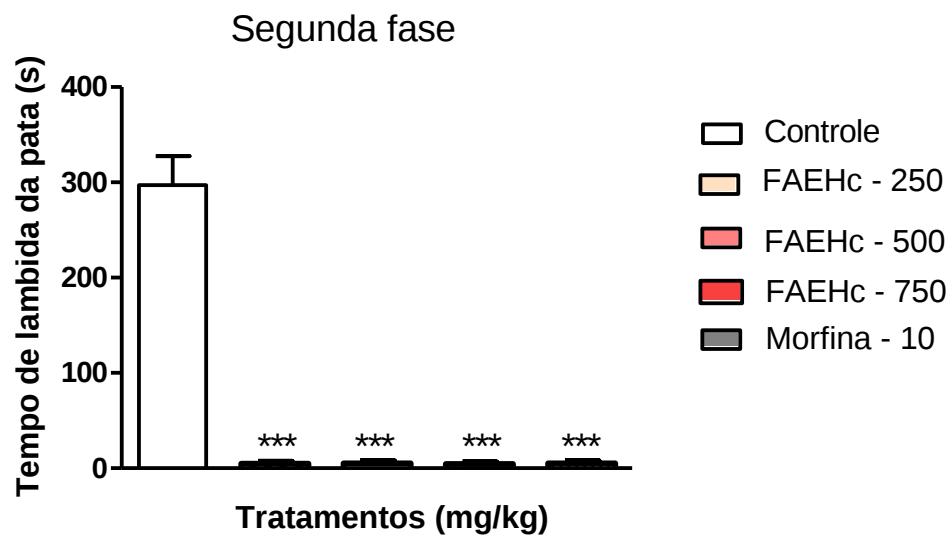


Figura 12. Efeito da FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). ***p<0,001 versus grupo controle.

6.1.2 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FAEHc NO TESTE DA FORMALINA

De acordo com o resultado apresentado na Figura 13, a lespedina na dose de 25 mg/kg ($71,4 \pm 6,9$ s), o tilirosídeo nas doses de 25 ($70,6 \pm 5,2$ s) e 50 ($59,4 \pm 5,9$ s) mg/kg e a administração conjunta de lespedina (25 mg/kg) e tilirosídeo (50 mg/kg) ($54,0 \pm 6,8$ s), promoveram diminuição no tempo de lambida da pata de forma significativa na primeira fase do teste da formalina, apresentando valores de inibição de 28,1%, 28,9%, 40,2% e 45,6% , respectivamente, comparados ao grupo controle ($99,3 \pm 10,5$ s). A morfina (10 mg/kg) produziu uma inibição de 69,8% ($30,0 \pm 6,7$ s) em relação ao grupo controle.

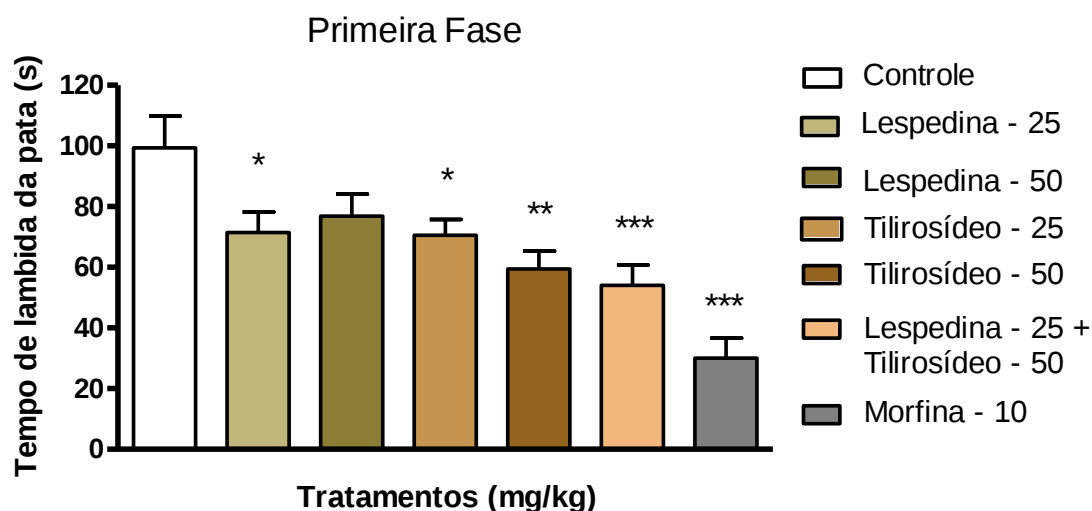


Figura 13. Efeito da lespedina (25 e 50 mg/kg, i.p.), tilirosídeo (25 e 50 mg/kg, i.p.), lespedina com tilirosídeo (25 e 50 mg/kg, i.p., respectivamente) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média ± e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). *p <0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus controle.

Na segunda fase do teste da formalina (Figura 14), o tratamento dos animais com lespedina na dose de 25 mg/kg ($85,4 \pm 14,3$ s) reduziu o tempo de lambida da pata em 73,7% e na dose 50 mg/kg ($137,5 \pm 33,8$ s) em 57,7%. O tilirosídeo nas doses de 25 ($205,6 \pm 26,5$ s) e 50 ($127,5 \pm 16,5$ s) mg/kg promoveram diminuição significativa no tempo de lambida da pata de 36,8% e 60,7%, respectivamente. Enquanto que, a administração de lespedina (25 mg/kg) e tilirosídeo (50 mg/kg) juntos ($112,0 \pm 6,4$ s) apresentaram 65,6% de inibição do tempo de lambida da pata, quando comparado ao

controle ($325,2 \pm 25,7$ s). O grupo tratado com morfina também reduziu significativamente este parâmetro, em 78,1% ($71,3 \pm 22,2$ s).

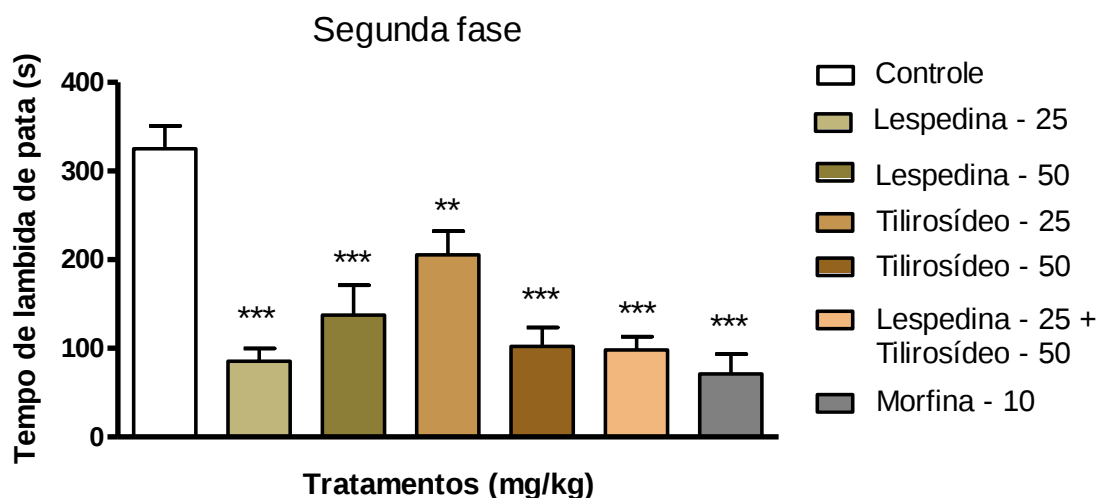


Figura 14. Efeito da lespedina (25 e 50 mg/kg, i.p.), tilirosídeo (25 e 50 mg/kg, i.p.), lespedina com tilirosídeo (25 e 50 mg/kg, i.p., respectivamente) e morfina (10 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). **p<0,01, ***p<0,001 versus grupo controle.

6.1.3 EFEITO DA FAEHc NO TESTE DO GLUTAMATO

Os resultados obtidos durante o teste do glutamato podem ser observados na Figura 15. Os camundongos tratados com a FAEHc na dose de 750 mg/kg apresentaram uma redução significativa do tempo de lambida da pata, exibindo um decréscimo de 84,0% ($9,1 \pm 5,6$ s) do comportamento nociceptivo, comparado ao grupo controle ($56,9 \pm 3,9$ s). O grupo tratado com MK801 (0,03 mg/kg), droga padrão, também reduziu significativamente este parâmetro apresentando 83,8% ($9,2 \pm 2,8$ s) de inibição.

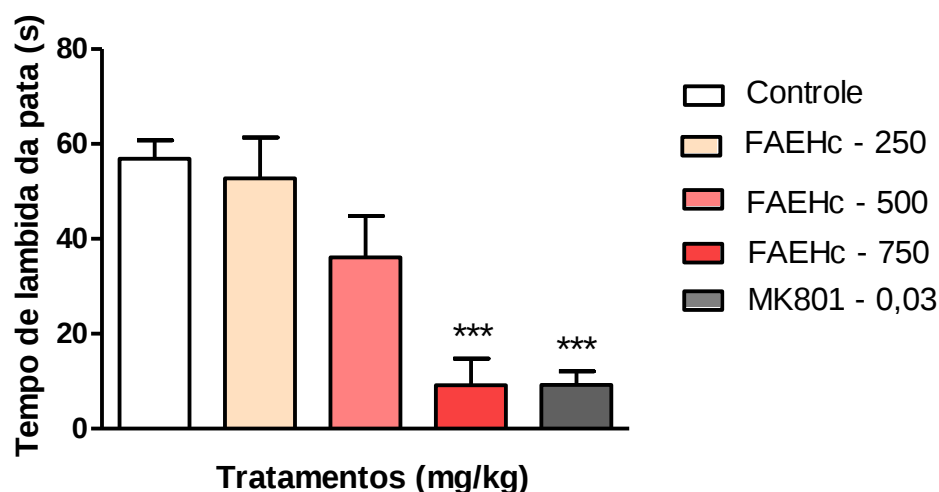


Figura 15. Efeito da FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg, i.p.) e MK801 (0,03 mg/kg, i.p.) no teste do glutamato em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). ***p<0,001 versus controle.

6.1.4 AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE *Herissantia crispa*

6.1.4.1 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OPIÓIDE

Como podemos observar na Figura 16, tanto a FAEHc na dose de 750 mg/kg ($17,5 \pm 5,6$ s) quanto a morfina ($26,5 \pm 5,1$ s) reduziram significativamente o tempo de lambida da pata na primeira fase do teste da formalina em 80,4% e 71,3%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($89,3 \pm 5,3$ s). O grupo tratado apenas com naloxona ($90,6 \pm 7,9$ s) não alterou o tempo de reação provocado pelo estímulo doloroso. O tratamento prévio da naloxona, administrado quinze minutos antes da FAEHc ou morfina, não modificou a antinocicepção provocada pela FAEHc ($36,1 \pm 6,8$ s), contudo o efeito produzido pela morfina ($78,6 \pm 5,3$ s) foi significativamente revertido.

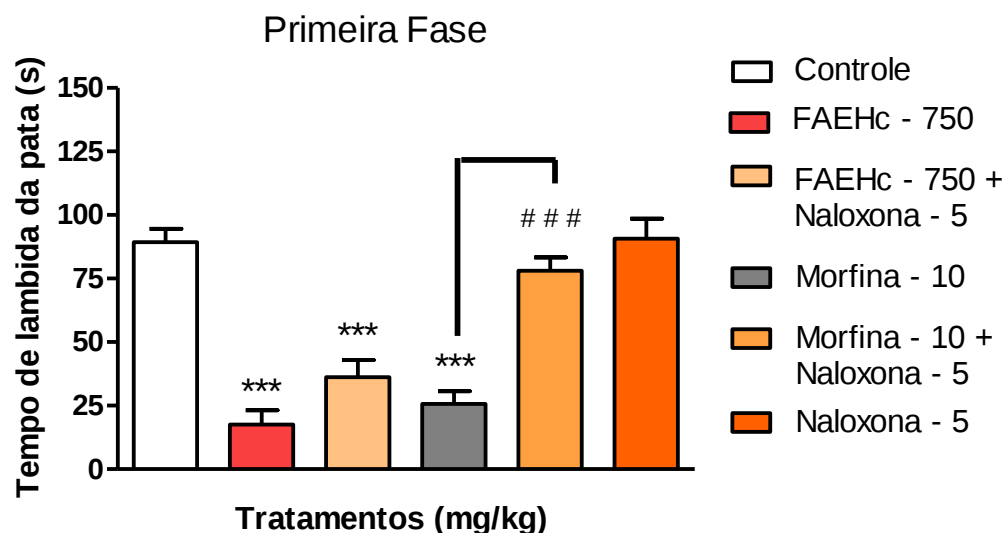


Figura 16. Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle, ###p<0,001 versus morfina.

Na segunda fase do teste da formalina, o tratamento dos camundongos com a FAEHc e morfina inibiram o comportamento nociceptivo em 100% , quando comparados ao grupo controle (268,9 $\pm$ 27,4 s). A administração prévia de naloxona não reverteu o efeito antinociceptivo da FACHc (14,0 $\pm$ 14,0 s), porém reverteu a ação da morfina (203,1 $\pm$ 27,9) (Figura 17).

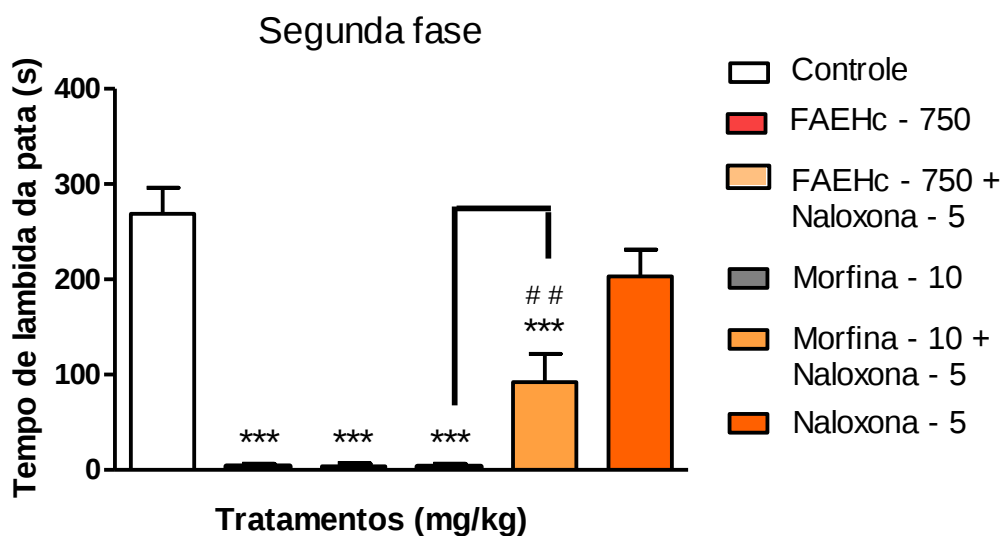


Figura 17. Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, s.c.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle, ###p<0,001 versus morfina.

6.1.4.2 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ADENOSINÉRGICO

Na primeira fase do teste da formalina, os camundongos tratados com a FAEHc (750 mg/kg) mostraram uma diminuição no tempo de lambida da pata em 81,9% ($17,2 \pm 4,9$ s), em relação ao grupo controle que recebeu apenas a formalina ($95,0 \pm 3,7$ s). O grupo de animais pré-tratados com a cafeína (10 mg/kg), quinze minutos antes da administração da FAEHc, apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo que não recebeu o antagonista ($54,1 \pm 5,6$ s), mas não houve reversão completa do efeito antinociceptivo induzido pela FAEHc apresentando uma inibição de 43% no tempo de lambida da pata (Figura 18). O grupo padrão tratado com cafeína, como esperado, não apresentou diferença significativa no tempo de lambida da pata ($85,9 \pm 3,3$ s), comparado ao grupo controle.

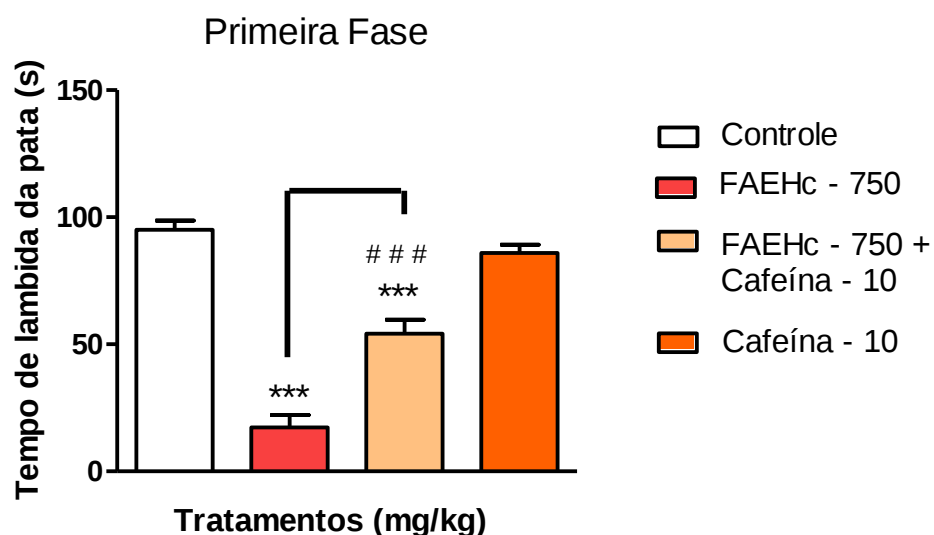


Figura 18. Efeito do pré-tratamento com cafeína (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média ± e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle, ###p<0,001 versus FAEHc.

A Figura 19 mostra uma inibição do tempo de lambida da pata da FAEHc (750 mg/kg) de 99,6% ($1,2 \pm 1,0$ s) em relação ao controle ($281,8 \pm 28,8$ s), na segunda fase do teste da formalina. No entanto, o tratamento prévio com cafeína não reverteu o efeito antinociceptivo da FAEHc ($2,3 \pm 1,5$ s). O grupo tratado com cafeína ($309,0 \pm 25,0$ s)

não apresentou diferença significativa no tempo de lambida quando comparado ao grupo controle.

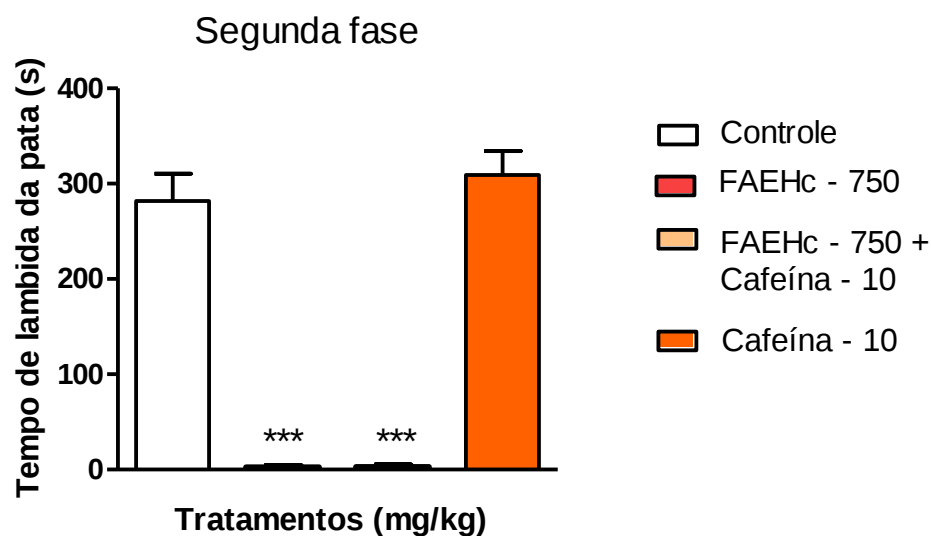


Figura 19. Efeito do pré-tratamento com cafeína (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle.

6.1.4.3 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA MUSCARÍNICO

Durante a primeira fase do teste da formalina, o grupo tratado com FAEHc (750 mg/kg) apresentou uma redução significativa de 81,7% ($16,5 \pm 4,8$ s) no tempo de lambida da pata, em relação ao grupo controle ($90,0 \pm 3,1$ s). No entanto, o pré-tratamento com atropina (5 mg/kg), quinze minutos antes da administração da FAEHc, reduziu o tempo de lambida em 47,8% ($47,0 \pm 7,4$ s) revertendo, parcialmente o efeito antinociceptivo provocado pelo tratamento com a FAEHc. O grupo tratado com atropina ($75,6 \pm 3,4$ s) não apresentou redução significativa no tempo de lambida, em relação ao grupo controle (Figura 20).

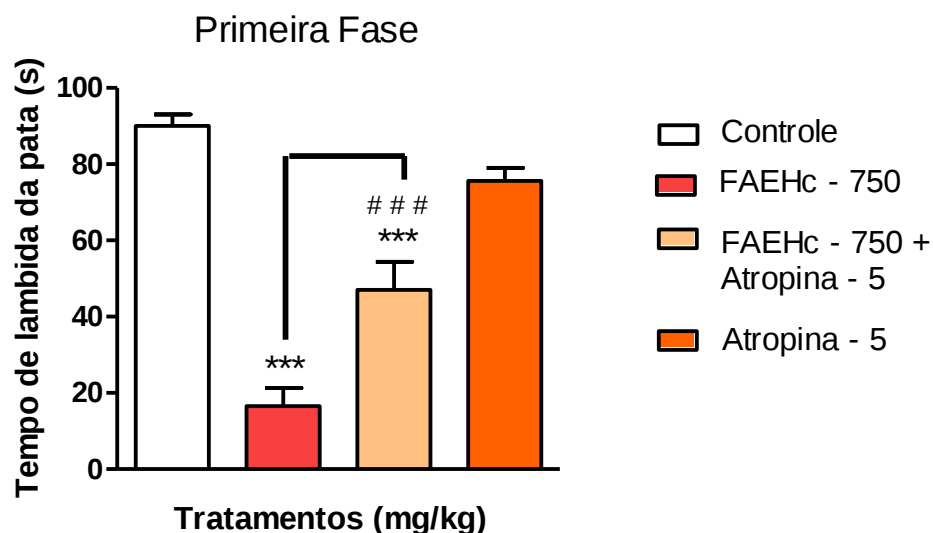


Figura 20. Efeito do pré-tratamento com atropina (5 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle, ###p<0,001 versus FAEHc.

Os resultados obtidos durante a segunda fase do teste da formalina, apresentados na Figura 21, demonstram que houve uma redução marcante no tempo de lambida da pata no grupo tratado com FAEHc (0 s), e esse efeito não sofreu reversão quando os animais receberam FAEHc após tratamento prévio com atropina ($0,8 \pm 0,5$ s), apresentando inibição deste parâmetro de 100% e 99,7%, respectivamente, em relação ao grupo controle ($250,4 \pm 34,8$ s). Os animais que receberam apenas atropina ($167,7 \pm 35,8$ s) não apresentaram resultados significativos em comparação ao controle.

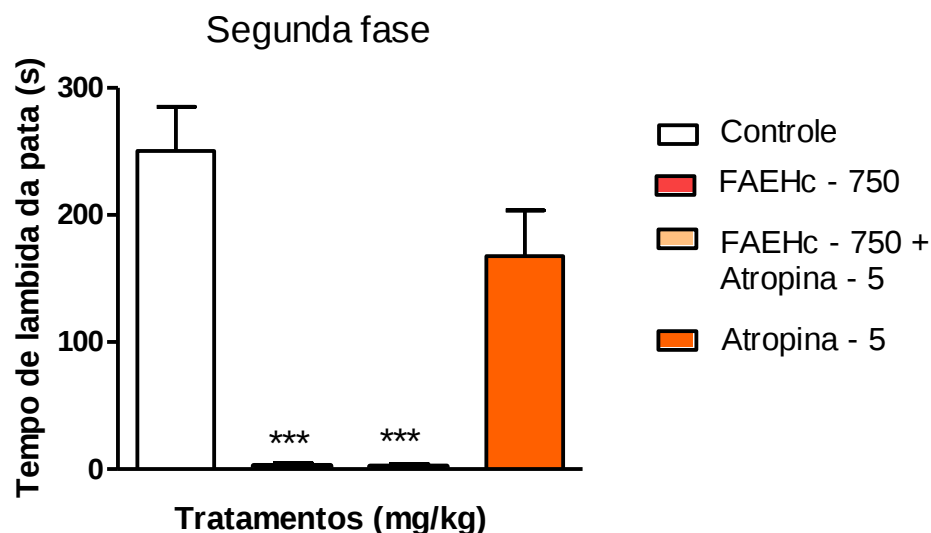


Figura 21. Efeito do pré-tratamento com atropina (5 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle.

6.1.4.4 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OXIDONITRÉRGICO

Os resultados apresentados na Figura 22 mostram que a FAEHc (750 mg/kg) promoveu uma diminuição significativa de 83,3% ($15,6 \pm 4,6$ s) no tempo de lambida da pata, em relação ao grupo controle ($93,4 \pm 3,9$ s). L-arginina (600 mg/kg), administrada quinze minutos antes da administração da FAEHc, inibiu completamente a antinocicepção induzida pela FAEHc ($66,0 \pm 16,8$ s). L-arginina administrada isoladamente, não alterou significativamente, o tempo de lambida da pata dos animais comparada com o grupo controle ($81,4 \pm 8,6$ s). No entanto, o tratamento com a L-arginina e L-NOARG (50 mg/kg), inibidor da enzima óxido nítrico sintase, promoveu inibição do tempo de lambida da pata de 43,6% ($52,7 \pm 3,8$ s).

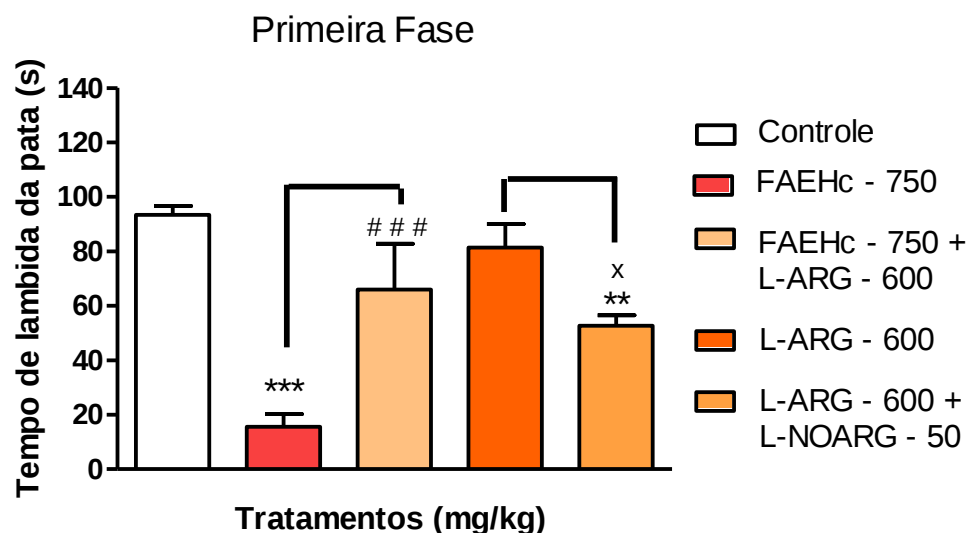


Figura 22. Efeito do pré-tratamento com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). **p<0,01, ***p<0,001 versus controle, ###p<0,001 versus FAEHc., x<0,05 versus L-arginina.

Na segunda fase do teste da formalina o grupo tratado apenas com FAEHc e o grupo tratado com FAEHc após a administração anterior de L-arginina resultou em uma redução no tempo de lambida da pata de 99,7% ($0,9 \pm 0,5$ s) e 99,3% ($2,1 \pm 0,4$ s), respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($284,6 \pm 28,5$ s). O grupo que recebeu apenas L-arginina não apresentou alteração na resposta nociceptiva ($259,8 \pm 50,3$ s), mas quando administrada junto com L-NOARG apresentou uma inibição do parâmetro observado de 48,2% ($147,3 \pm 22,4$ s) (Figura 23).

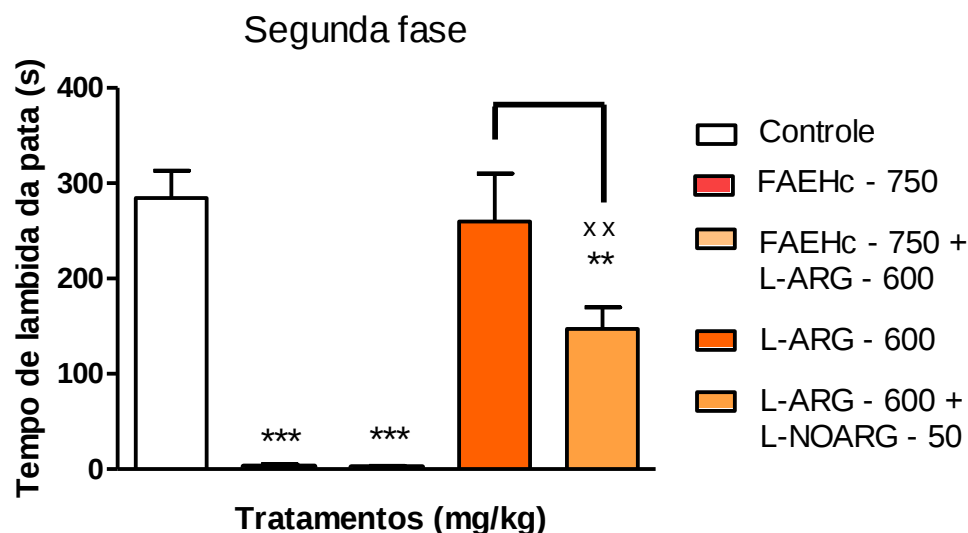


Figura 23. Efeito do pré-tratamento com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). **p<0,01, ***p<0,001 versus controle, xx<0,01versus L-arginina.

6.1.4.5 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA α_2 -ADRENÉRGICO

Como apresentado nas Figuras 24 e 25, os camundongos tratados com FAEHc (750 mg/kg) apresentaram uma diminuição na resposta à dor de 88,1% ($9,5 \pm 3,0$ s) na primeira e 99,6% ($1,0 \pm 0,4$ s) na segunda fase, quando comparados ao grupo controle ($79,8 \pm 5,4$ e $265,8 \pm 23,8$ s).

No grupo de animais que recebeu apenas a ioimbina (0,15 mg/kg), não foi observada qualquer alteração no tempo de lambida da pata em nenhuma das fases ($65,4 \pm 3,3$ e $220,7 \pm 45,0$ s), em relação ao grupo controle. O pré-tratamento dos animais com ioimbina que, posteriormente, receberam a FAEHc resultou numa inibição de 84,2% ($12,6 \pm 4,7$ s) na primeira fase e 99,5% ($1,4 \pm 0,3$ s) na segunda fase do teste da formalina, indicando que não houve reversão do efeito.

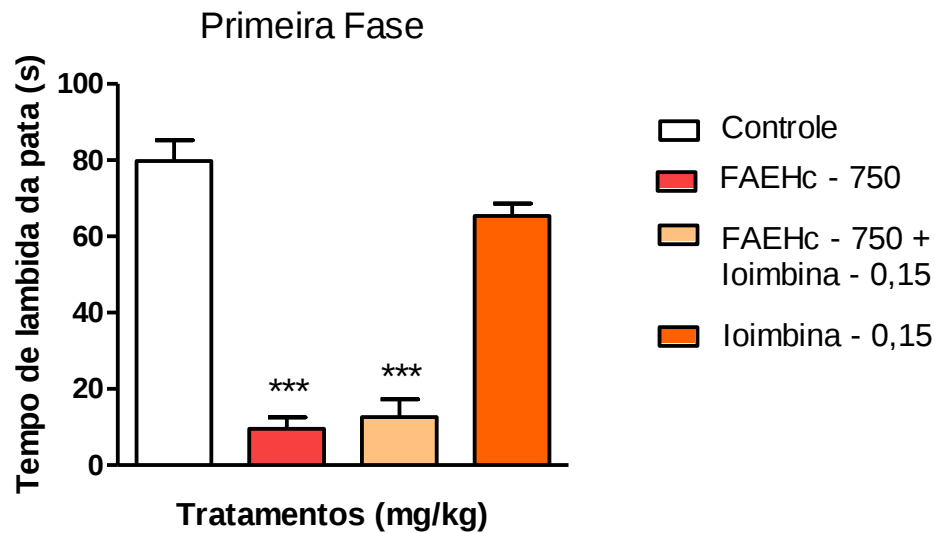


Figura 24. Efeito do pré-tratamento com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle.

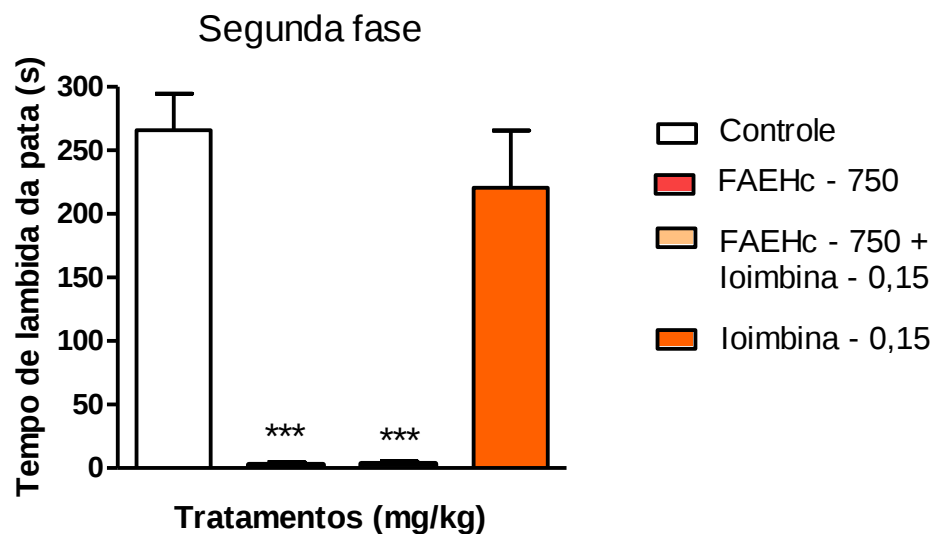


Figura 25. Efeito do pré-tratamento com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle.

6.1.4.6 PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE K^+_{ATP}

As figuras 26 e 27 representam o efeito da FAEHc sobre os canais de K^+_{ATP} , nas duas fases do teste da formalina. O tratamento dos animais com a FAEHc (750 mg/kg) promoveu redução de 88,3% ($9,0 \pm 2,7$ s) no tempo de lambida da pata na primeira fase e de 99,7% ($0,8 \pm 0,4$ s) na segunda fase, em relação ao controle ($76,6 \pm 6,3$ e $262,3 \pm 30,4$ s, respectivamente).

O pré-tratamento dos animais com glibenclamida (10 mg/kg) não foi capaz de reverter o efeito da FAEHc, que reduziu em 67,4% ($25,0 \pm 5,4$ s) e 99,6% ($1,1 \pm 1,1$ s) a nocicepção produzida pela formalina na primeira e segunda fase do teste. Os animais que receberam apenas glibenclamida não apresentaram variação significativa no tempo de lambida da pata em relação ao controle em nenhuma das fases do teste da formalina ($66,6 \pm 7,2$ e $196,8 \pm 2,1$ s).

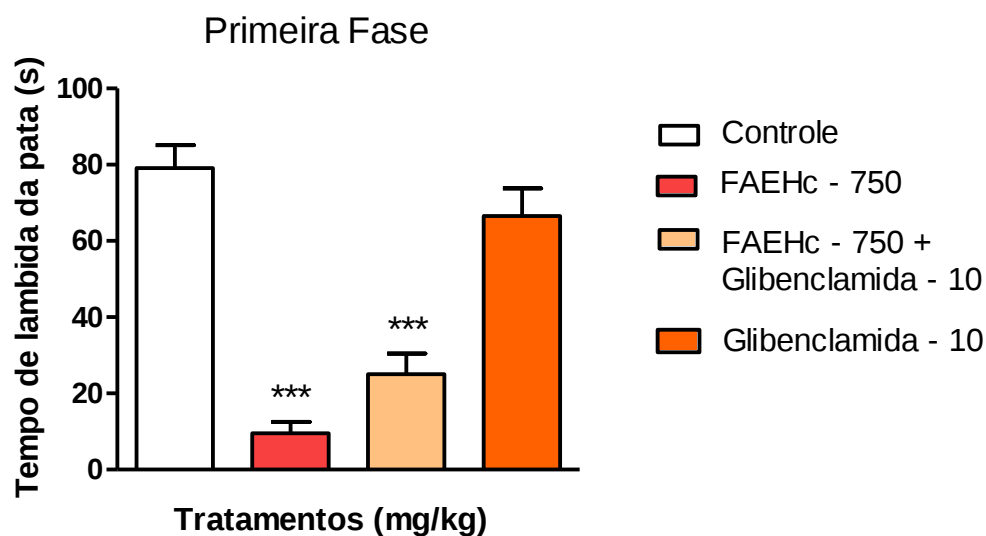


Figura 26. Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina em camundongos. Os valores expressos como média ± e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle.

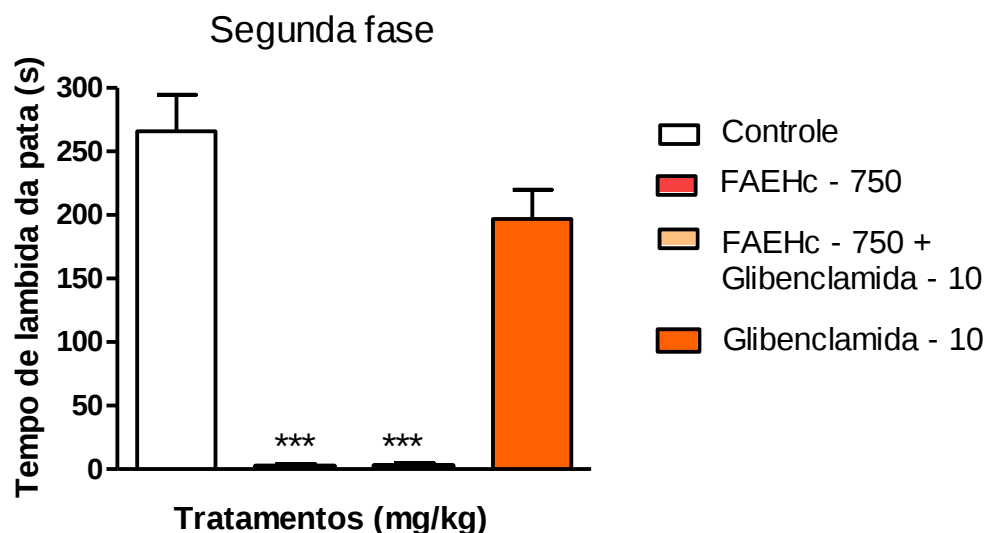


Figura 27. Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela FAEHc (750 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Neuman-Keuls). ***p<0,001 versus controle.

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

6.2.1 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Os resultados obtidos durante o teste do edema de pata induzido por carragenina estão apresentados na Figura 28 e 29. A administração da FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg) em camundongos, trinta minutos antes da injeção intraplantar de 20 μ L de carragenina, reduziu significativamente o edema de pata, na primeira hora de observação nas doses de 250 ($0,6 \pm 0,1$ mm), 500 ($0,5 \pm 0,1$ mm) e 750 ($0,5 \pm 0,0$ mm) mg/kg, em 40,0%, 50,0% e 50,0%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas carragenina ($1,0 \pm 0,0$ mm).

Na segunda hora de observação, também foi observado uma diminuição na variação de espessura da pata em 40,0% (250: $0,6 \pm 0,1$ mm), 60,0% (500: $0,4 \pm 0,1$ mm) e 40,0% (750: $0,6 \pm 0,0$ mm), em relação ao grupo controle ($1,0 \pm 0,1$ mm). Na terceira hora, houve diminuição do edema de 45,5% (250: $0,6 \pm 0,1$ mm), 54,5% (500: $0,5 \pm 0,1$ mm) e 54,5% (750: $0,5 \pm 0,1$ mm) comparado ao controle ($1,1 \pm 0,1$ mm).

As doses de 250, 500 e 750 mg/kg, apresentaram igualmente uma redução no parâmetro analisado de 46,2% ($0,7 \pm 0,0$ mm) na quarta hora em relação ao controle

($1,3 \pm 0,1$ mm). Na sexta hora do teste, as doses testadas continuaram promovendo redução da espessura da pata de 36,4% (250: $0,7 \pm 0,1$ mm), 45,4% (500: $0,6 \pm 0,1$ mm) e 36,4% (750: $0,7 \pm 0,0$ mm) quando comparadas com o grupo controle ($1,1 \pm 0,1$ mm).

Vinte e quatro horas após os tratamentos iniciais, a FAEHc foi capaz de diminuir significativamente a espessura da pata nas doses de 250 ($0,6 \pm 0,1$ mm), 500 ($0,4 \pm 0,1$ mm) e 750 ($0,6 \pm 0,1$ mm) mg/kg, em 57,1%, 71,4% e 57,1%, respectivamente, em relação ao grupo controle ($1,4 \pm 0,1$ mm). Quarenta e oito horas após os tratamentos, a FAEHc promoveu redução edema de 50% (250: $0,9 \pm 0,2$ mm), 55,5% (500: $0,8 \pm 0,2$ mm) e 44,4% (750: $1,0 \pm 0,1$ mm) em relação ao grupo que recebeu apenas carragenina ($1,8 \pm 0,2$ mm). A FAEHc não apresentou qualquer efeito em nenhuma das doses testadas setenta e duas horas após o início do experimento.

O pré-tratamento com dexametasona (2 mg/kg), anti-inflamatório esteroidal, inibiu a formação do edema de pata nas primeiras vinte e quatro horas após os tratamentos iniciais, apresentando redução do edema de 40,0% (1 hora: $0,6 \pm 0,0$ mm), 60,0% (2 horas: $0,4 \pm 0,1$ mm), 54,4% (3 horas: $0,5 \pm 0,0$ mm), 69,2% (4 horas: $0,4 \pm 0,1$ mm), 63,6% (6 horas: $0,4 \pm 0,1$ mm) e 50,0% (24 horas: $0,7 \pm 0,1$ mm), como esperado. O grupo controle negativo (salina) não apresentou formação de edema de pata em nenhum dos tempos analisados.

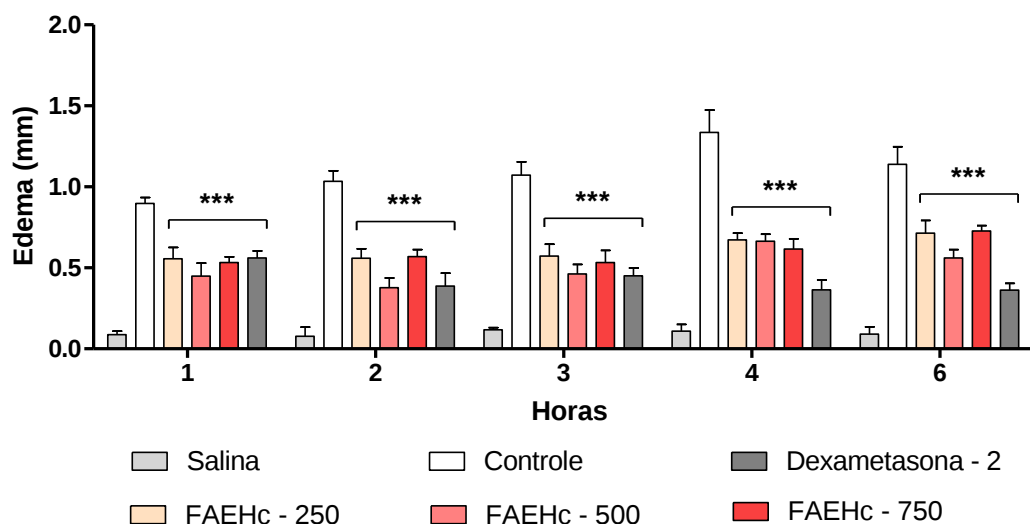


Figura 28. Efeito da administração da FAEHc (250, 500, 750 mg/kg, i.p) e da dexametasona (2 mg/kg, s.c.) no edema de pata induzida por carragenina nas primeiras 6 horas após os tratamentos, em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). ***p<0,001 versus controle.

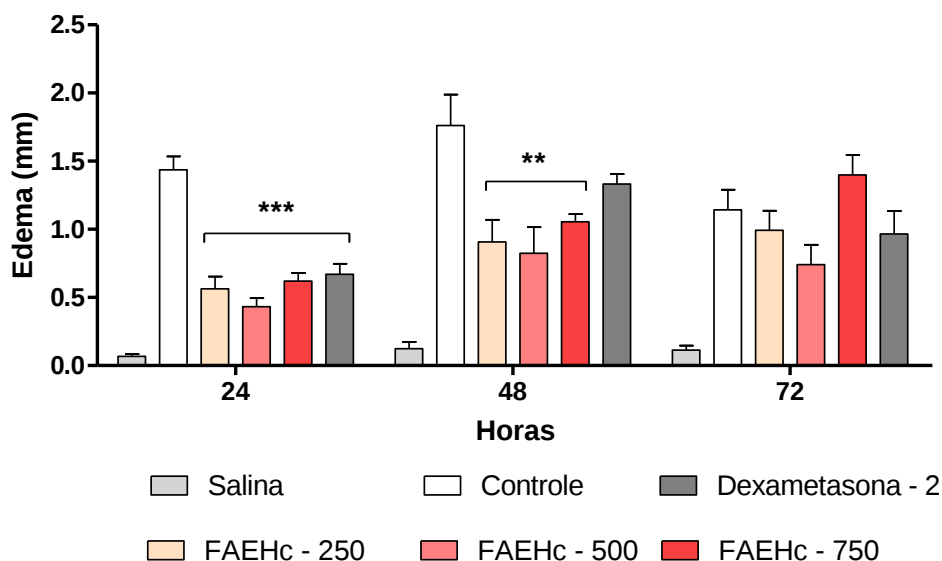


Figura 29. Efeito da administração da FAEHc (250, 500, 750 mg/kg, i.p) e da dexametasona (2 mg/kg , s.c.) no edema de pata induzida por carragenina 24, 48 e 72 horas após os tratamentos, em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). **p<0,01, ***p<0,001 versus controle.

6.2.2 PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

A Figura 30 mostra o efeito da FAEHc (250, 500 e 750 mg/kg) e da dexametasona (2 mg/kg) sobre a migração de células na peritonite induzida pela carragenina. Como observado na Figura 30A, o tratamento dos animais com a FAEHc resultou em uma diminuição significativa da migração de leucócitos, promovida pela administração peritoneal de carragenina, em 48,5% ($5,3 \pm 0,8 \times 10^6/\text{mL}$), apenas na dose de 750 mg/kg, em relação ao controle ($10,3 \pm 1,2 \times 10^6/\text{mL}$). A dexametasona (2 mg/kg), droga padrão, inibiu em 43,7% ($5,8 \pm 0,3 \times 10^6/\text{mL}$) o infiltrado de leucócitos celular. Essa inibição foi atribuída a uma redução na migração de neutrófilos de 60,5% ($3,0 \pm 0,4$) pela dose de 750 mg/kg, comparado ao grupo controle ($7,6 \pm 1,0$). A dexametasona (2 mg/kg) inibiu em 57,9% ($3,2 \pm 0,3$) a migração de neutrófilos (Figura 30B). A FAEHc não interferiu na infiltração de células mononucleares em nenhuma das doses testadas (Figura 30C)

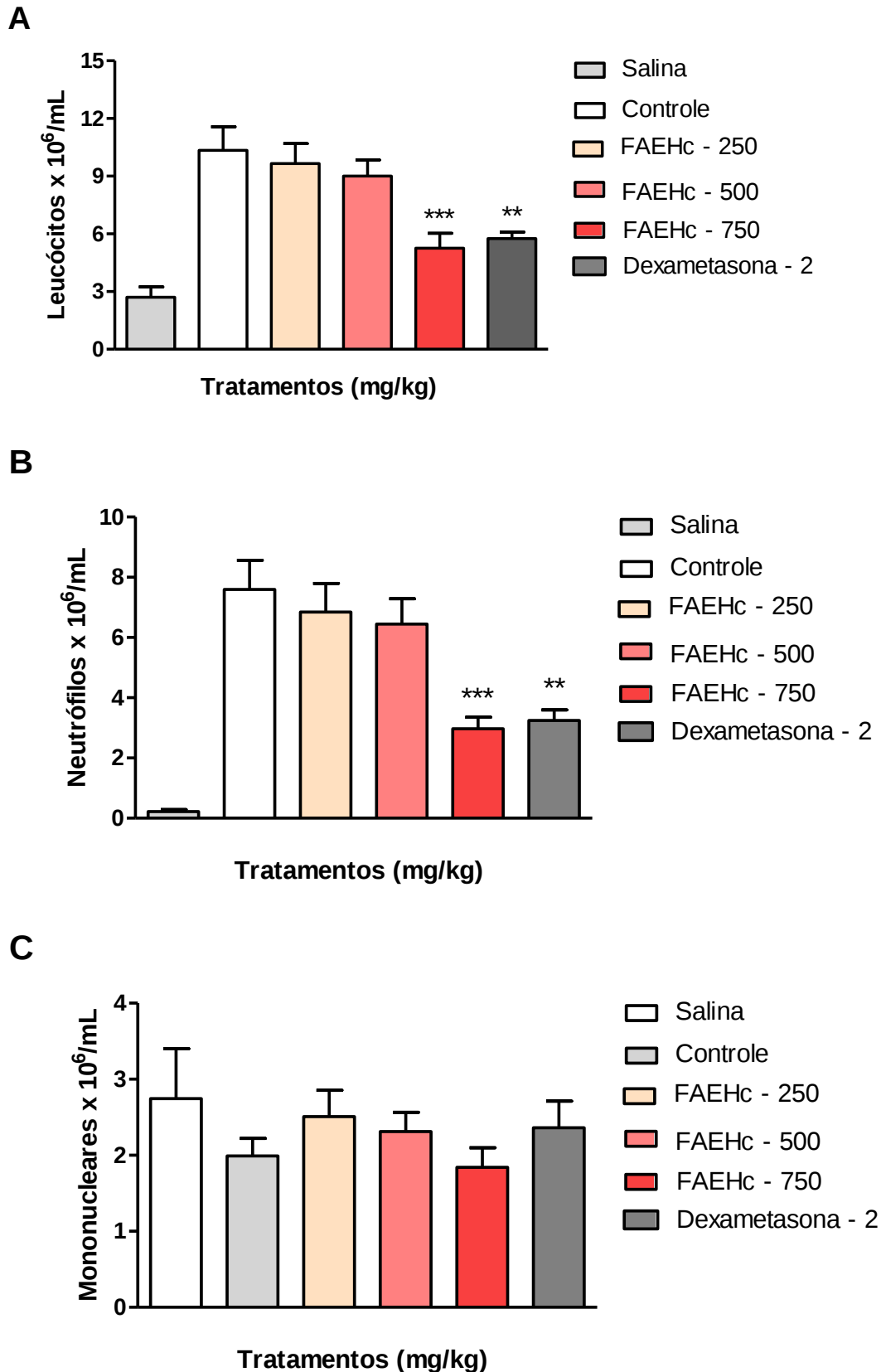


Figura 30. Efeito da administração da FAEHc (250, 500, 750 mg/kg, i.p) e da dexametasona (2 mg/kg, s.c.) sobre a migração de leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C), na peritonite induzida por carragenina, em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). **p<0,01, ***p<0,001 versus controle.

6.2.3 NÍVEIS DE CITOCINAS TNF- α E IL-1 β NO LAVADO PERITONEAL

A administração de carragenina produziu o aumento significativo dos níveis de TNF- α ($622,0 \pm 103,8$) e IL-1 β ($143,0 \pm 30,1$) após 4 horas quando comparado ao grupo tratado apenas com salina. O tratamento dos animais com a FAEHc reduziu significativamente as concentrações de TNF- α nas doses de 250 ($196,2 \pm 20,2$), 500 ($116,2 \pm 28,6$) e 750 ($53,7 \pm 48,6$) mg/kg, em 68,5%, 81,3% e 91,4%, respectivamente (Figura 31A). Além disso, a FAEHc nas doses de 250 ($60,5 \pm 5,9$), 500 ($39,5 \pm 7,4$) e 750 ($35,2 \pm 6,0$) mg/kg também foi capaz de promover uma diminuição nos níveis de IL-1 β de 57,7%, 72,4% e 75,4%, respectivamente. A dexametasona (2 mg/kg) reduziu em 76,3% ($147,7 \pm 48,6$) os níveis de TNF- α e em 76,6% ($33,4 \pm 15,9$) em relação ao grupo controle (Figura 31B).

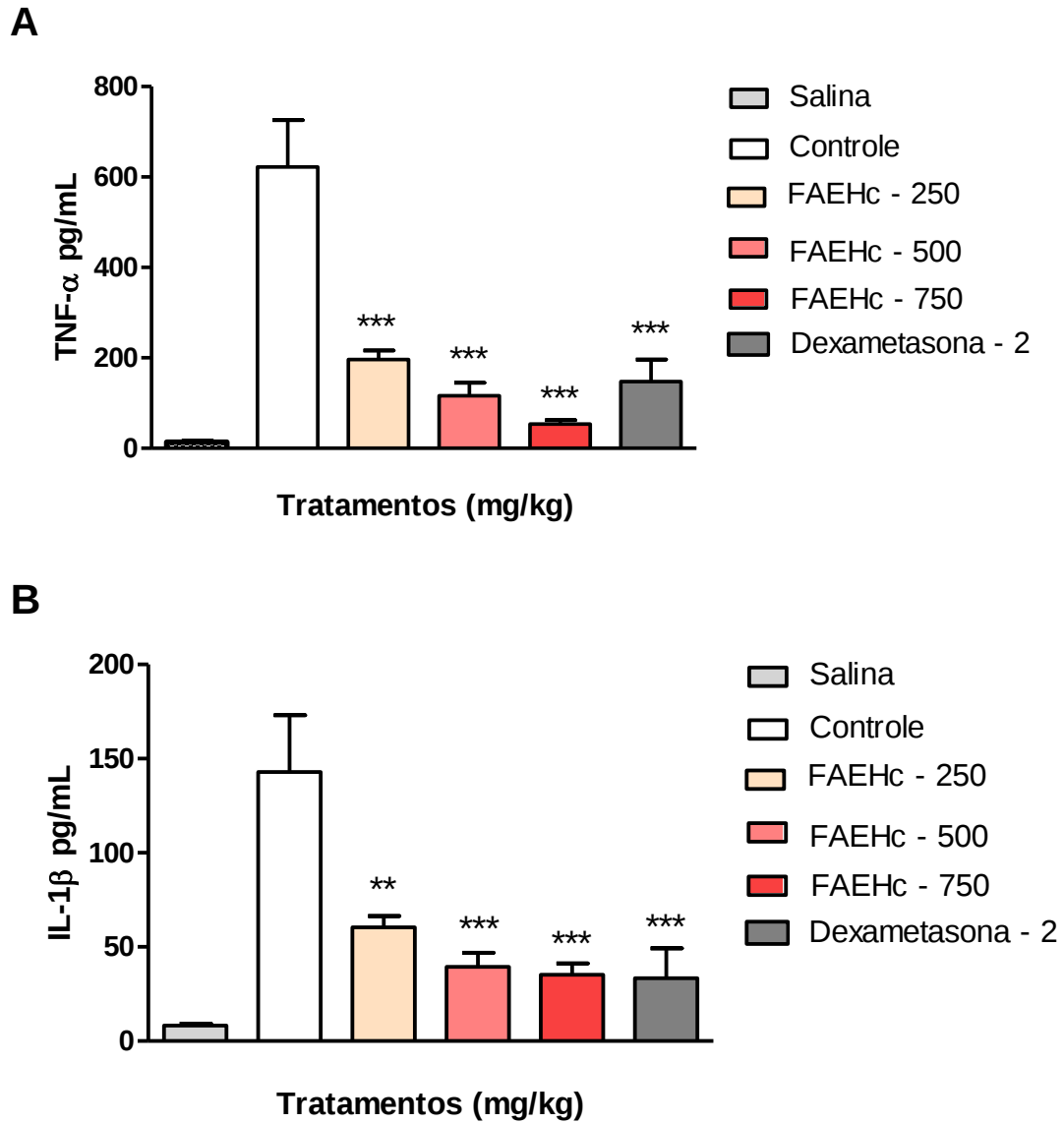


Figura 31. Efeito da administração da FAEHc (250, 500, 750 mg/kg, i.p) e da dexametasona (2 mg/kg , s.c.) sobre os níveis de TNF- α (A) e IL-1 β (B), no modelo de peritonite induzida por carragenina., em camundongos. Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n=8). (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). ***p<0,001 versus controle.

Discussão



7 DISCUSSÃO

A *H. crispa* é uma planta constituída quimicamente de vários flavonóides com atividades farmacológicas comprovadas (COSTA et al., 2009; SARTORI et al., 2003; PERES et al., 2000; KANEUCHI et al., 2003; CARLIXTO et al., 2000; WILLAIN-FILHO, 2005; SALA et al., 2003; MATSUDA et al., 2002; JORGE, 2003). Ainda há poucos relatos sobre esta espécie na literatura, porém, estudos realizados durante o trabalho de mestrado apresentaram resultados que sugerem que a *H. crispa* possui atividade antinociceptiva. O extrato etanólico de *H. crispa* promoveu redução significativa do número de contorções abdominais, no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. No teste da placa quente, o extrato etanólico de *H. crispa* promoveu aumento da latência ao estímulo térmico apenas na dose de 500 mg/kg, 60 minutos após o tratamento. Além disso, esse extrato foi capaz de diminuir o tempo de lambida da pata nas duas fases do teste da formalina (PEREIRA, 2009). Estes resultados motivaram o interesse da continuidade da investigação da atividade antinociceptiva e dos mecanismos de ação envolvidos, além de terem despertado também o interesse sobre o estudo da atividade anti-inflamatória da *H. crispa* porque a maior dose testada apresentou efeito significativo na segunda fase do teste.

Apesar do extrato etanólico de *H. crispa* ter apresentado resultados relevantes no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e ser um teste muito sensível, o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é um modelo de nocicepção inespecífico capaz de detectar o efeito antinociceptivo de analgésicos centrais, como os opióides, e periféricos, como os AINEs (RAMEZANI; HOSSINZADEH; DANESHMAND, 2001; MOHAMAD et al., 2010).

O teste de placa quente é um teste sensível e específico, utilizado para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais, pois o calor é frequentemente utilizado como um estímulo nóxico, em modelos de dor aguda (SULAIMAN et al., 2009; ONG et al., 2011). No entanto, no teste da placa quente, o extrato etanólico de *H. crispa* não apresentou antinocicepção significativa em todas as doses.

Por sua vez, o teste de formalina é o modelo de dor clínica mais utilizado, no qual, a primeira fase parece ser resultante da estimulação química direta dos nociceptores, enquanto a segunda fase é dependente da inflamação periférica e modificações no processamento central (TJOLSEN et al, 1992, CAPONE; ALOISI,

2004).O teste da formalina permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase que ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção da formalina resultando em um estímulo químico direto de fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas, sobretudo a fibra C, sendo sensível principalmente a drogas que agem em nível central, como a morfina (HUNSKAAR; FASMAR; HOLE, 1985, FERREIRA et al., 2006, AMARAL et al. 2007; GONÇALVES et al. 2008).

A segunda fase ocorre entre 15 a 30 minutos após a administração da formalina. Mediadores inflamatórios formados nos tecidos periféricos, como as prostaglandinas, serotonina, histamina e bradicinina, induzem mudanças funcionais nos neurônios, do corno dorsal que, ao longo do tempo promove a facilitação da transmissão em nível espinhal (HUNSKAAR; FASMAR; HOLE, 1985; FRANÇA et al, 2001; OLIVEIRA; SOUZA; ALMEIDA, 2008). Nesta fase, ocorre também aumento do nível dos mediadores excitatórios na medula espinhal, entre eles, glutamato e NO (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992; LOPES et al., 2010).

A formalina induz a produção e liberação de NO (OMOTE et al., 2001), o qual pode ser considerado um componente essencial da resposta nociceptiva / pró-inflamatória através da estimulação da produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e PGs (MARCINKIEWICZ; GRABOWSKA; CHAIN, 1995; SAUTEBIN et al., 1995; GUIMARÃES et al., 2010).

Entre a primeira e a segunda fase do teste da formalina, há um período de repouso chamado de “interfase” que ocorre devido a uma ativação de processos inibitórios não regulados por mecanismos que envolvem o GABA, já que agonistas gabaérgicos de receptores do tipo A inibem a diminuição de manifestações de dor durante esse período (HENRY et al., 1999; LIRA, 2001).

Drogas de ação central, tais como os analgésicos opióides inibem ambas as fases do teste da formalina, entretanto, drogas de ação periférica, como os anti-inflamatórios somente são eficazes na segunda fase (SHIBATA et al., 1989; MIÑO et al., 2002).

Portanto, na condução dos experimentos, o teste da formalina foi escolhido por tratar-se de um modelo seguro e válido de nocicepção sensível a várias classes de drogas analgésicas. A formalina produz uma resposta bifásica distinta onde drogas analgésicas e anti-inflamatórias podem atuar diferentemente na primeira e segunda fase do teste (MORTEZA-SEMNANI et al., 2002). Nos experimentos realizados utilizando esse modelo, o extrato etanólico de *H. crisper* apresentou uma redução da nocicepção induzida pela formalina nas duas fases do teste.

Antes do presente trabalho, todos os estudos com a espécie *H. crispera* realizados pela equipe do nosso laboratório tinham utilizado apenas o extrato etanólico de *H. crispera*. Para aprofundar a avaliação da atividade antinociceptiva da *H. crispera*, testamos as fases acetato de etila e hidroalcoólica obtidas do extrato etanólico de *H. crispera* utilizando o teste da formalina como padrão. Inicialmente as fases foram analisadas na dose de 750 mg/kg por ser a dose que promoveu o melhor efeito no teste da formalina quando os animais foram tratados com o extrato etanólico de *H. crispera* (PEREIRA et al., 2012). Foi observado que as fases FAEHc e FHAHc promoveram redução do tempo de lambida da pata nas duas fases do teste. Em seguida, realizamos o tratamento dos animais com a FAEHc nas doses de 250, 500 e 750 mg/kg, para determinar se uma dose menor produziria um efeito semelhante à dose de 750mg/kg. Neste experimento, foi observada uma inibição do efeito das duas fases da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, apresentando-se dose-dependente apenas na primeira fase do teste. Suplementando os resultados apresentados pelo extrato etanólico de *H. crispera* (PEREIRA et al., 2012), podemos sugerir que a FAEHc possui atividade antinociceptiva tanto em nível central quanto periférico, podendo estar associado a um efeito anti-inflamatório, visto que houve redução da nocicepção de forma mais efetiva na segunda fase do teste.

Na tentativa de determinar a possível participação dos constituintes químicos da FAEHc na atividade antinociceptiva, os flavonóides lespedina e tilirosídeo, isolados da *H. crispera* e considerados marcadores químicos da planta (MATIAS, 2009), foram também investigados. Foi observado que, durante as duas fases do experimento, os flavonóides diminuíram o tempo de lambida da pata, no entanto, esse resultado foi menos pronunciado do que os resultados obtidos com a FAEHc. O fato da lespedina e do tilirosídeo serem as substâncias isoladas em maior quantidade das frações em estudo, e ambas apresentarem resultados antinociceptivos significativos, porém inferiores, em intensidade, ocorreu-nos que, se estão presentes na mesma fração, os flavonóides poderiam estar contribuindo de uma forma sinérgica no efeito observado. Para testar tal hipótese, as duas substâncias foram administradas simultaneamente, e nas doses que produziram melhor efeito (lespedina 25 mg/kg e tilirosídeo 50 mg/kg). Apesar de terem reduzido o tempo de lambida da pata nas duas fases do teste da formalina, os resultados obtidos como consequência da adição dos flavonóides foram desapontadores, uma vez que não foi possível observar um efeito semelhante àquele, obtido apenas com a FAEHc. Assim, os resultados exibidos ao administrarmos os flavonóides sugerem que

estes participam na promoção da atividade antinociceptiva evidenciada com a FAEHc, mas essa resposta não pode ser atribuída somente à lespedina e ao tilirosídeo. Esses constituintes são marcadores químicos da planta, no entanto, não são os únicos responsáveis pelo efeito terapêutico total. Provavelmente, este efeito está relacionado à ação conjunta do fitocomplexo que constitui a FAEHc ou mesmo outros compostos presentes no extrato etanólico de *H. crispa* (EMEA, 2008; BONKANKA; SÁNCHEZ-MATEO; RABANAL, 2011). Este fato pode ser reputado, observando-se os efeitos antinociceptivos expressivos ao administrarmos a FAEHc ou o extrato etanólico de *H. crispa* nos animais, comparados com os efeitos inferiores ao administrarmos os flavonoides, sejam isolados ou em adição.

Após todos estes experimentos, a FAEHc foi escolhida para dar sequência aos experimentos por ter apresentado efeito mais acentuado do que a FHAHc e os flavonóides, assim como pela facilidade de obtenção desta fase pelos colaboradores do laboratório da fitoquímica.

Após a realização desses testes, o estudo seguiu investigando-se o(s) mecanismo(s) de ação antinociceptivo pelo qual a FAEHc exerce este efeito nos animais.

Inicialmente, com a finalidade de avaliar o envolvimento dos aminoácidos excitatórios no efeito antinociceptivo da FAEHc, foi realizado o teste da nocicepção induzida pelo glutamato. Os aminoácidos excitatórios (aspartato e glutamato) apresentam papel relevante no processo de sensibilização do corno dorsal da medula espinhal, uma vez que a estimulação das fibras aferentes primárias induz a liberação desses transmissores nesse local (MILLAN, 1999; 2002). Beirith e colaboradores (2002) propuseram que o glutamato pode ser utilizado como agente na indução da nocicepção.

O sistema glutamatérgico é um dos mais importantes sistemas envolvidos na modulação da nocicepção e da antinocicepção, tanto em nível periférico quanto central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL; NEECK, 2001; HUANG; ZHANG; MCNAUGHTON, 2006; MCKENNA, 2007). A resposta nociceptiva induzida pelo glutamato tem sua ação mediada pela ativação dos receptores glutamatérgico: NMDA, AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato), cainato e metabotrópico. (BLEAKMAN, ALT, NISENBAUM, 2006). A ativação destes receptores, principalmente receptores NMDA, pode estimular a atividade de enzimas intracelulares e a produção de uma variedade de segundos mensageiros, tais como NO, pela NOS, que por sua vez produz hiperalgesia

(MELLER; DYKSTRA; GEBHART, 1996). Neste sentido, substâncias que diminuem a nocicepção induzida por glutamato podem estar atuando em seus receptores como antagonistas ou inibindo a síntese de NO pelo bloqueio da NOS (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

Os resultados mostraram que a FAEHc foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo glutamato nos camudongos tratados com a dose de 750 mg/kg. Estes dados permitem sugerir que a ação antinociceptiva da FAEHc na dor causada pelo glutamato pode estar associada, pelo menos em parte, a sua interação com o sistema glutamatérgico ou com a produção do NO.

Grande parte do conhecimento sobre os mecanismos de ação de psicofármacos tem sido baseada na interação biológica que ocorre entre receptores e ligantes durante a transmissão neuronal (SCHEFFER, 2006). Na perspectiva de esclarecer se o mecanismo de ação envolvido na resposta antinociceptiva da FAEHc estaria relacionado com as vias inibitórias da dor, foram utilizados antagonistas farmacológicos capazes de impedir a ligação entre o agonista e um receptor específico. Assim, se o tratamento prévio com o antagonista promover reversão da antinocicepção causada pela substância-teste, indica que esta via de sinalização participa do mecanismo de ação desta substância. Durante esta etapa, foi utilizado o teste da formalina, por ser o modelo ideal para esclarecer possíveis mecanismos do efeito antinociceptivo de uma possível substância analgésica (HUANG et al., 2010).

Os receptores opióides são localizados tanto em nível central como periférico, nas terminações de neurônios aferentes primários (SAWYNOK, 2003). Os receptores influenciam direta ou indiretamente na atividade antinociceptiva dos seus agonistas, participando da percepção e modulação da dor em sítios localizados em nível espinhal e supraespinhal (ROGERS et al., 1992; BRUEHL et al., 2009). Os receptores opióides são classificados como receptores acoplados à proteína Gi/o e, quando ativados, inibem a adenilil ciclase. Além disso, promovem a abertura de canais para potássio e inibem a abertura dos canais para cálcio controlados por voltagem, levando à redução da excitabilidade neuronal e da liberação de neurotransmissores (SAWYNOK, 2003; RANG et al, 2007). Eles podem, ainda, acoplar-se a vários outros sistemas de segundos mensageiros, envolvidos na via da fosfolipase C, sendo responsáveis pelos efeitos indesejados relacionados ao uso dos opióides (tolerância, sensibilização e abstinência) (STEIN; ZOLLNER, 2009; SEHGAL; SMITH; MANCHIKANTI, 2011).

A naloxona é um antagonista opiáceo não seletivo utilizado clinicamente para reverter a depressão cardiovascular e respiratória associada à overdose de narcóticos. Devido à sua capacidade de antagonizar o efeito de drogas opióides, como a morfina, a naloxona é amplamente utilizada como ferramenta farmacológica na pesquisa de mecanismos envolvendo receptores opióides (BATISTA; ALMEIDA; BHATTACHARYYA, 1995; SULAIMAN et al., 2008; JIN et al., 2010).

Com o intuito verificar a participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da FAEHc, os animais foram previamente tratados com a naloxona. Não foi evidenciada qualquer reversão da atividade antinociceptiva com o uso de tal antagonista. Por sua vez, o efeito da morfina, foi revertido pela naloxona como era esperado. Desta forma, o resultado indica que a FAEHc não exerce seus efeitos por meio da ativação dos receptores opióides.

Em seguida, foi investigada a participação do sistema adenosinérgico na inibição da nocicepção promovida pela FAEHc. Estudos de dor demonstraram que algumas drogas com atividade analgésica tem sua ação relacionada à ativação de receptores de adenosina. De acordo com suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e moleculares, os receptores de adenosina estão classificados em quatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Todos estes receptores estão acoplados a proteína G (BURNSTOCK; FREDHOLM; VERKHRATSKY, 2011; FREDHOLM et al., 2011).

A adenosina é um neurotransmissor/modulador endógeno que pode produzir efeitos associados a antinocicepção pela ativação de receptores A₁, ou ação pró-nociceptiva pela ativação de recetores A₂ e A₃ (DOAK; SAWYNOK, 1995; TAIWO; LEVINE, 1990; WU et al., 2005). Por sua vez, a cafeína é um antagonista não seletivo de receptores de adenosina e atua bloqueando receptores do tipo A₁ e A₂ (SAWYNOK; REID; DOAK, 1995; SAWYNOK; REID; FREDHOLM, 2010), e foi utilizada como ferramenta farmacológica para verificar o possível envolvimento dos receptores de adenosina.

Os resultados obtidos mostraram que a cafeína foi capaz de reverter a antinocicepção apresentada pela FAEHc apenas na primeira fase do teste. Estes resultados sugerem que o sistema adenosinérgico pode estar envolvido na resposta antinociceptiva da FAEHc, pois o pré-tratamento com a cafeína impediu a redução do tempo de lambida da pata pela FAEHc. Mas a participação desta via parece estar interferindo apenas em nível central, uma vez que não foi observada alteração no efeito da FAEHc na segunda fase do teste da formalina.

Dando sequência à investigação, testamos a via colinérgica. Muitos trabalhos sugerem que a acetilcolina (ACh) exibe efeito antinociceptivo podendo atuar através de várias vias monoaminérgicas e, que a ACh desempenha um papel de modulador do processo doloroso, participando do processo de inibição descendente. Os receptores muscarínicos modulam a nocicepção em nível de medula espinhal (JAIN, 2004; DECKER, RUETER; BITNER, 2004; JONES; DUNLOP, 2007). A administração de agonistas colinérgicos aumenta a liberação de neurotransmissores inibitórios como o GABA e glicina, demonstrando que o sistema colinérgico tem importância fundamental no controle endógeno da dor. (JONES; DUNLOP, 2007). A atropina é um antagonista competitivo não-seletivo de receptores muscarínicos central e periférico da ACh (SHI et al., 2011).

Com relação à influência do sistema colinérgico sobre o efeito antinociceptivo da FAEHc, os resultados sugerem que o sistema citado pode estar envolvido no mecanismo de ação da FAEHc, pois houve reversão da antinocicepção na primeira fase do teste da formalina. No entanto, é provável que os receptores muscarínicos não participem da resposta em nível periférico da FAEHc.

Citado anteriormente, quando mencionamos o estudo da via do glutamato, está bem descrito que o sistema oxidonitrérgico, também exerce um papel importante na modulação na nocicepção. A ativação de receptores glutamatérgicos, especialmente o NMDA, pode estimular a atividade de enzimas intracelulares como a NOS através do aumento de cálcio intracelular e a produção de uma variedade de segundos mensageiros, como o NO, relacionados com a transmissão e perpetuação da condução dolorosa (BEIRITH et al., 2002).

O NO é derivado da L-arginina por ação da NOS que apresenta três isoformas: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS). O NO e suas enzimas associadas estão envolvidas em muitos processos fisiológicos e patológicos (ESPLUGUES, 2002; PARADISE et al., 2010; OLSON; VLIET, 2011) e várias linhas de pesquisa indicaram que o NO tem um papel complexo e diverso na modulação da dor (MICLESCU; GORDH, 2009; MILLAN, 2002; CHEN et al., 2010; CHUNG et al. 2006).

O NO é um importante neurotransmissor envolvido no processo nociceptivo e, no corno dorsal da medula espinhal, ele contribui para o desenvolvimento da sensibilização central. Por outro lado, dados experimentais também demonstraram que o NO inibe a nocicepção tanto das vias periférica como central. Além disso, tem sido

mostrado que o NO medeia o efeito analgésico de opióides, de anti-inflamatórios não-esteroidais e de outras substâncias analgésicas. Os mecanismos envolvidos nos efeitos nociceptivos e antinociceptivos do NO ainda não estão totalmente caracterizados, são necessários trabalhos adicionais para elucidar o seu papel na transmissão nociceptiva (CURRY et al., 2011).

No presente estudo, ficou demonstrado que o sistema oxidonitrérgico possivelmente está envolvido na ação antinociceptiva da FAEHc em nível central. Tal sugestão se origina no fato que o pré-tratamento dos animais com o substrato para NOS, L-arginina, reverteu, significativamente, o efeito antinociceptivo causada pela FAEHc apenas na primeira fase do teste. Foi possível observar que quando tratados com a L-arginina e em seguida com o inibidor de L-arginina, L-NOARG, os animais exibiram um comportamento característico antinociceptivo, em relação ao grupo controle nas duas fases do teste da formalina, diferente da ausência de efeito evidenciado quando apenas L-arginina foi administrada. Este resultado corrobora com os resultados encontrados no teste da nocicepção induzida pelo glutamato, visto que a via glutamatérgica pode envolver a participação do NO.

Ainda continuando a pesquisa dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva da FAEHc, foi investigada a participação do sistema α_2 -adrenérgico. As propriedades antinociceptivas de agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos refletem a modulação da influência excitatória das fibras aferentes primárias nos neurônios de projeção (MILLAN, 2002). O receptores α_2 quando ativados por um agonista inibem a enzima adenilato ciclase causando, conseqüentemente, uma diminuição do adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular. Uma diminuição no AMPC causa redução da ativação das proteínas alvo reguladoras, impedindo sua fosforilação, que, por sua vez, altera a resposta biológica celular. Outro mecanismo relacionado ocorre através da saída de potássio oriundo do meio intracelular através de um canal ativado (BAGATINI et al., 2002).

Os receptores α_2 -adrenérgicos encontram-se envolvidos na analgesia produzida após estimulação de diversos componentes do sistema endógeno, como por exemplo a substância cinzenta periaqueductal e diversas áreas do tronco cerebral que alojam grupos de neurônios noradrenérgicos (JONES, 1992). Efetivamente, a analgesia produzida por estimulação dessas áreas pode ser inibida por aplicação de antagonistas dos receptores α_2 -adrenérgicos. Dessa maneira, examinamos o possível envolvimento

dos receptores α_2 no efeito antinociceptivo da FAEHc, usando animais pré-tratados com ioimbina, um antagonista desse receptor.

Os resultados obtidos indicam que a ioimbina não foi capaz de reverter a resposta antinociceptiva da FAEHc, e portanto, podemos sugerir que os receptores α_2 não devem estar envolvidos no mecanismo de ação antinociceptivo da FAEHc.

Outra via que poderia estar relacionada ao efeito antinociceptivo da FAEHc é a via que envolve os canais de K^+_{ATP} . A glibenclamida, uma sulfoniluréia utilizada na clínica médica como antidiabético, atua bloqueando especificamente canais para K^+_{ATP} (OCANA et al., 2004). Os canais de K^+ neuronais têm um papel fundamental no controle da atividade neuronal e na propagação do sinal através do sistema nervoso (SHIEH et al., 2000; MACKINNON, 2003). Sabe-se ainda que os canais de K^+ centrais, especialmente os canais de K^+ dependente de voltagem (K^+_v), pertencem à família dos canais de K^+ retificador de entrada (K^+_{ir}) e estão envolvidos na percepção da dor (OCANA et al., 2004; HAJHASHEMI; AMIN, 2011). A proteína $G_{i/o}$ é capaz de abrir os dois tipos de canais K_{ir} : os regulados pela proteína G (MARK; HERLITZE, 2000) e os K^+_{ATP} (WADA et al., 2000; OCANA et al., 2004). Os resultados obtidos mostraram que, não foi observada interferência, pelo menos diretamente, do antagonista dos canais de K^+_{ATP} na ação antinociceptiva apresentada pela FAEHc em nenhuma das fases do teste de nocicepção induzida pela formalina.

Considerando os resultados encontrados neste estudo, onde cafeína, atropina e L-arginina bloquearam o efeito da FAEHc apenas durante a primeira fase de observação do teste da formalina, pode ser sugerida a presença de um componente de ação central, e não periférico, neste mecanismo de ação, com envolvimento de transmissão adenosinérgica, muscarínica e da oxidonitrérgica, no efeito da FAEHc.

É importante ressaltar que, no teste da formalina, a segunda fase não pode ser interpretada como consequência da primeira. Ela origina-se de mecanismos periféricos e também da ativação de neurônios centrais sensibilizados devido à inflamação periférica, bem como da ativação de neurônios aferentes primários (COELHO et al., 2005; ARAÚJO et al., 2009).

Dessa forma, são necessários estudos adicionais através de vias de sinalização para que haja a elucidação do mecanismo pelo qual a FAEHc age inibindo a nocicepção induzida pela formalina.

Após a tentativa de caracterizar a resposta antinociceptiva da FAEHc, prosseguimos os experimentos na tentativa de avaliar a atividade anti-inflamatória da

mesma, uma vez que, a FAEHc apresentou resposta acentuada na segunda fase do teste da formalina e, também, por saber que a dor está intimamente relacionada à inflamação, pois os mediadores inflamatórios liberados na injúria tecidual são capazes de modificar a transmissão e a excitabilidade dos nociceptores (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

O estudo da atividade anti-inflamatória da FAEHc foi iniciado através do teste do edema de pata induzido pela carragenina, uma vez que este modelo experimental é o mais utilizado e apresenta sensibilidade e reprodutibilidade (BARBOSA-FILHO et al., 2006c; SOUTO et al., 2011). A carragenina é um agente flogístico que causa uma reação inflamatória reprodutível e facilmente mensurável, fatos que tem contribuído para mantê-la como uma das principais ferramentas farmacológicas para experimentos que envolvem a análise de processos inflamatórios agudos (LAZZARINI et al., 2006).

Neste modelo a carragenina promove um aumento imediato da permeabilidade vascular resultante de inúmeros mediadores inflamatórios liberados, como histamina, serotonina e bradicinina, e subsequentemente sustentado pela liberação de PGs e NO, produzidos principalmente pelas isoformas de COX- 2 e iNOS, respectivamente, bem como por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α . A permeabilidade vascular ocorre simultaneamente com o recrutamento de neutrófilos (0-6h), seguido por monócitos (6-24 h) para o local da inflamação (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971; NANTEL et al., 1999; POSADAS et al., 2004).

A administração de carragenina na pata de animais é um modelo caracterizado por induzir uma resposta inflamatória persistente (NANTEL et al., 1999; PASSOS et al., 2007; MARIOTTO et al., 2008). Este modelo é conhecido por induzir a formação de edema em duas fases, a primeira fase se desenvolve nas 6 horas iniciais e é conhecido por produzir um edema de pouca intensidade, seguido pela segunda fase que começa em torno de 24 horas após a administração de carragenina e mostra uma pronunciada formação de edema, com efeito máximo entre 48 e 72 horas (POSADAS et al., 2004).

Uma hora após a administração do agente flogístico ocorre a produção de radicais livres e a liberação dos mediadores pró-inflamatórios que estimulam a liberação de bradicinina, serotonina, histamina, leucotrienos e NO (BURCH; DEHAAS, 1990; WIRTH et al., 1992). Entre 1- 6 horas, há produção mais efetiva de TNF- α , IL-1 β , NO e PGs, os quais contribuem para o aumento da permeabilidade vascular, reforçando a formação do edema (SALVEMINI et al., 1996). Os anti-inflamatórios não-esteroidais reduzem preferencialmente a fase tardia, em virtude da inibição da isoforma COX-2,

que é responsável pela geração de prostanóides pró-inflamatórios (VANE; BOTTING, 1998).

De acordo com os resultados encontrados, podemos sugerir que a FAEHc apresenta atividade anti-inflamatória, provavelmente pela redução dos mediadores pró-inflamatórios e/ou inibição das enzimas COX-2 ou iNOS responsáveis pela migração dos leucócitos para o local da inflamação, pois o tratamento dos animais com a FAEHc conseguiu reduzir o edema induzido pela carragenina nas primeiras 48 horas após administração deste agente flogístico, enquanto a dexametasona promoveu efeito anti-inflamatório até 24 horas após o tratamento. A dexametasona e outros glicocorticóides inibem a liberação de mediadores inflamatórios de várias células, em particular leucócitos, plaquetas, células endoteliais e macrófagos residentes, além de serem potentes inibidores da enzima iNOS (KLIMENKO; PAVLOVA, 1999). Estes resultados corroboram com os resultados proeminentes encontrados na segunda fase do teste da formalina que se caracteriza por ser a fase inflamatória.

Dando continuidade ao estudo da atividade anti-inflamatória da FAEHc realizamos o teste da peritonite induzida pela carragenina, com o objetivo de verificar se a atividade anti-edematogênica apresentada pela FAEHc estaria relacionada a inibição da migração leucocitária.

Durante o processo inflamatório, a migração de leucócitos para o tecido inflamado é um fator de extrema importância. Os neutrófilos contribuem de forma significativa para destruição de patógenos e para cicatrização dos tecidos, constituindo as primeiras células sanguíneas a serem recrutadas para o local da inflamação. Entretanto, a permanência destas células no tecido poderá levar a danos teciduais como se observa nas maiorias das doenças inflamatórias crônicas como as autoimunes e asma (MEDZHITOV, 2010).

A administração intraperitoneal da carragenina provoca um infiltrado de neutrófilos vindos da vênula mesentérica para cavidade peritoneal. Esse evento ocorre em consequência da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular e da liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-8 e prostanoides (HALL et al., 1998).

A FAEHc apresentou redução do número de leucócitos no líquido peritoneal na maior dose testada (750 mg/kg) de forma semelhante ao tratamento com dexametasona. Essa inibição foi atribuída a uma redução na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório sugerindo modulação na expressão de moléculas de superfície celular e/ou

produção de citocinas/quimiocinas importantes para o processo de migração de leucócitos para o sítio inflamado.

As citocinas TNF- α e IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo inflamatório, de grande relevância para o início da fase aguda da inflamação e amplificação do processo inflamatório, induzindo a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais, que consequentemente facilitam a diapedese de leucócitos, além de induzirem a produção de proteínas de fase aguda (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; MEDZHITOV, 2010). O TNF- α é uma citocina que tem sido relacionada à patogênese de diversas doenças, exercendo potentes efeitos inflamatórios, tais como, indução da expressão endotelial de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (EL ALWANI et al., 2006), ativação de neutrófilos e fagócitos mononucleares, aumento da permeabilidade vascular, além de atuar como um fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A IL-1 β tem a capacidade de induzir a transcrição de citocinas (como exemplo: IL-6, IL-8 e IL-12) e quimiocinas, ativação da expressão de moléculas de adesão que favorece a migração e ativação de leucócitos e também é responsável pelo aumento da expressão de genes que codificam enzimas como a COX-2; fosfolipase A₂ e iNOS (WITKAMP; MONSHOUWER, 2000).

A FAEHc reduziu de forma significativa os níveis de TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal dos animais com todas as doses testadas, indicando que a redução da migração de leucócitos ocasionada pela FAEHc seja, pelo menos em parte, consequência da inibição na produção TNF- α e IL-1 β . Dessa forma, este resultado suplementa a atividade anti-inflamatória evidenciada na segunda fase do teste da formalina e no teste do edema de pata induzido pela carragenina, sugerindo que a FAEHc promove controle da inflamação.

De forma sucinta, foi possível destacar através dos resultados apresentados no presente trabalho, que a FAEHc apresenta atividade antinociceptiva, sugerindo um efeito tanto central como periférico. Porém, apesar dos flavonóides majoritários estarem contribuindo para antinocicepção apresentada pela FAEHc, esse efeito não se deve exclusivamente a esses marcadores da planta. Além disso, os resultados também colaboram para o esclarecimento dos mecanismos farmacológicos pelos quais a planta exerce seu efeito antinociceptivo. E somando-se à atividade antinociceptiva, também foi evidenciada a atividade anti-inflamatória da FAEHc, relacionada a redução de

importantes citocinas pró-inflamatórias. No entanto, são necessários mais estudos para melhor caracterização destes efeitos.

Todos esses resultados apontam perspectivas favoráveis para o conhecimento científico da espécie *H. crispa*, uma vez que há poucos dados na literatura a respeito de trabalhos farmacológicos com esta espécie e, também, com outras plantas do gênero *Herissantia*.

Conclusões



8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo *in vivo* utilizando camundongos, conclui-se que:

- As FAEHc e FHAHc apresentam atividade antinociceptiva, possivelmente em nível central e periférico, como observado no teste da formalina e do glutamato;
- Os flavonóides, lespedina e tilirosídeo, apresentaram atividade antinociceptiva. No entanto, os resultados não foram tão acentuados quanto das fases, não podendo ser atribuído apenas a estes marcadores químicos da planta os efeitos antinociceptivos; destarte, o efeito antinociceptivo total de *H. crispa*, está relacionado, provavelmente, a ação sinérgica entre outras substâncias presentes na fase FAEHc além das substâncias isoladas, citadas acima.
- A FAEHc exerce sua atividade antinociceptiva devido a participação, pelo menos parcialmente, dos sistemas adenosinérgico, muscarínico e oxidonitrérgico envolvendo mecanismos centrais, uma vez que, o efeito antinociceptivo da FAEHc foi revertido pela utilização dos antagonistas cafeína, atropina e pelo precursor de NO, respectivamente, na primeira fase do teste da formalina.
- A FAEHc promove atividade anti-inflamatória caracterizada pela redução do edema induzido por carragenina e por diminuir a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para cavidade peritoneal no modelo da peritonite induzida por carragenina por um mecanismo que envolve a redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β .

Referências

REFERÊNCIAS

ADEREM, A., SMITH, K.D. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. **Seminars in Immunology**, v.16, p. 55 – 67, 2004.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmagognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AHMED, Z.; KAZMI, S. N. H.; MALIK, A. Phytochemical investigation of *Abutilon pakistanicum*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 1342-1344, 1990.

ALAM, M., JOY, S., USMAN ALI, S.. Screening of *Sida cordifolia* Linn. *Sida rhomboidea* Linn. and *Triumfetta rotundifolia* Lam. for anti-inflammatory and antipyretic activities. **Indian Drugs**, v. 28, n. 9, p. 397–400, 1991.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; AGRA, M. F.; ALMEIDA, E. R.; MAJETICH, G.; BHATTACHARYYA, J. Analgesic effect of Dioclenol and Dioflorin isolated from *Dioclea grandiflora*. **Journal of Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 1-5, 2000.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310-322, 2001.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40–56, 2004.

AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; REIS, A. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; MACEDO, R. O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 (Supl.), p. 696-720, 2006.

AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G.; NETO, M. R. A.; NETO, P. F. T.; MOURA, B. A.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, P. F.; VASCONCELOS, S. M.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive Effect of the Monoterpene

R-(+)-Limonene in Mice. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p.1217-1220, 2007.

AMES, J. M.; MACLEOD, G. Volatile components of okra. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1201-1207, 1990.

ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; ROCHA, N. F. M.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 337-344, 2009.

ARAWWAWALA, L. D. A. M.; ARAMBEWELA, L. S. R.; RATNASOORIYA, W. D. *Alpinia calcarata* Roscoe: A potent antiinflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 889– 892, 2011.

ARRAU, S.; DELPORTE, C.; CARTAGENA, C.; RODRIGUEZ-DIAZ, M.; GONZALEZ, P.; SILVA, X.; CASSELS, B. K.; MIRANDA, H. F. Antinociceptive activity of *Quillaja saponaria* Mol. saponin extract, quillaic acid and derivatives in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 164–167, 2011.

BAGATINI, A.; GOMES, C.R.; MASELLA, M.Z.; REZER, G. Dexmedetomidina: farmacologia e uso clínico. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 5, p. 606-617, 2002.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MARTINS, V. K. M.; RABELO, L. A., MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; MEDEIROS, I. A. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p. 421- 446, 2006a.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 258-285, 2006b.

BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 141- 148, 2007.

- BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R., M.R.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; LIMA, K. V. B.; LEITÃO DA-CUNHA, E. V.; FECHINE, I. M.; TAKEMURA, O.S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 109-139, 2006c.
- BARRETO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO, J. R. J. X. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetativas para a síntese e planejamento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 147-210, 2004
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, A. C. **Sistemática de Angiospermas no Brasil 2**. Imprensa Universitária, Viçosa, 1991
- BATISTA, J. S.; ALMEIDA, R. N.; BHATTACHARYYA, J. Analgesic effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 207-210, 1995.
- 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. I., JESSEL, T. M. **Principles of Neuroscience**. McGraw-Hill, New York, p. 472–491, 2000.
- BEIRITH, A; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.
- BEIRITH, A., SANTOS, A. R., CALIXTO, J. B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Research**, v. 969, p. 110-6, 2003.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CALIXTO, J. B. Action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of supraspinal of the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 345, p. 233-245, 1998.
- BENNETT, G. J. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: Focus on the NMDA-receptor. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 19, suplem. 1, p. 2-6, 2000.

- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.
- BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M. Selectins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 2, p. 379-87, 1993.
- BLEAKMAN, D.; ALT, A.; NISENBAUM, E. S. Glutamate receptors and pain. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, v. 17, p. 592–604, 2006.
- BOADI, W. Y.; IYERE, P. A.; ADUNHYA, S. E. Effect of quercetin and genistein on copper-and iron-induced peroxidation in methyl linolenate. **Journal of Applied Toxicology**, v. 23, p. 363-369, 2003.
- BONKANKA, C. X.; SÁNCHEZ-MATEO, C. C.; RABANAL, R. M. Antinociceptive activity of *Hypericum grandifolium* Choisy in mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 122–128, 2011.
- BOVINE, M.G.; OKANO-CARVALHO, R.M.; VIEIRA, M.F. Malvaceae A. Juss. no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 52, p. 17-47, 2001.
- BRAUN-FILHO, J. L.; BRAUN, L. Dor aguda. **Dor, Diagnóstico e Tratamento**, v.1, p. 3-14, 2004.
- BRENNAN, F.; CARR, D. B.; COUSINS, M. Pain management: a fundamental human right. **Anesthesia & Analgesia**, v. 105, p. 205-21, 2007.
- BRUEHL, S.; BURNS, J.W.; CHUNG, O.Y.;CHONT, M. Pain-related effects of trait anger expression: neural substrates and the role of endogenous opioid mechanisms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, p. 475-491, 2009.
- BURNSTOCK, G.; FREDHOLM, B. B.; VERKHRATSKY A. Adenosine and ATP receptors in the brain. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 973-1011, 2011.
- BURCH, R. M.; DEHAAS, C. A. Bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.342, p.189-193, 1990.
- CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytoterapy Research**, v. 14, p. 401-418, 2000.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R.A.; RAE, G. A.; MEDEIROS, Y.S. In: **Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research**; R.M. Burch, Marcel Dekker Inc. New York, 1990, p. 88.

CÂMARA, C. C. **Estudo dos efeitos antinociceptivos, comportamentais e regenerativos do tratamento com gabapentina em modelo experimental de dor neuropática**. 2009. 220f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia / UFC, Fortaleza, Ceará, 2009.

CAPONE, F.; ALOISI, A. M.. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, p. 223:229, 2004.

CARMODY, D. R.; DEJONG, W.; SMITH, T. R.. Buttonweed seed oil a source of linoleic acid. **Oil e Soap**, p. 263, 1945.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **The Lancet**, v. 353, p. 2051-2058, 1999.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.48, p.137-158, 1998.

CASEY, K. L. The imaging of pain: background and rationale, In: CASEY, K.L.; BUSHNELL, M.C. **Pain Imaging**, p. 1 –29, 2000

CECHINEL FILHO, V. **Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a partir de Produtos Naturais. Correlação Estrutura Química – Atividade Biológica**. Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis-SC,1995.

CHAPMAN, C.R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v. 353, p. 2233-2237, 1999.

CHEN, Y.; BOETTGER, M. K.; REIF, A.; SCHMITT, A.; UCEYLER, N.; SOMMER, C. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. **Molecular Pain**, v. 6, p. 13, 2010.

CHIANG, L. C.; CHIANG, W.; LIU, M. C.; LIN, C. C. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 194-198, 2003.

CHOPADE, A. R.; MULLA, W. A. Novel strategies for the treatment of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 66, p. 429–444, 2010.

CHUNG, E.; BURKE, B.; BIEBER, A. J.; DOSS, J. C.; OHGAMI, Y.; QUOCK, R. M. Dynorphin mediated antinociceptive effects of L-arginine and SIN-1 (an NO donor) in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 70, p. 245–250, 2006.

COELHO, L. P.; REIS, P. A.; CASTRO, F. L.; GAYER, C. R. M.; LOPES, C. S.; SILVA, M. C. C.; SABINO, K. C. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 109-116, 2005.

COSTA, D. A.; SILVA, D. A.; CAVALCANTI, A. C.; MEDEIROS, M. A. A.; LIMA, J. T.; CAVALCANTE, J. M. S.; SILVA, B. A.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-*o*- β -D-(6''-*e*-*p*-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 901-903, 2007.

COSTA, D. A.; MATIAS, W. N.; LIMA, I. O.; XAVIER, A. L.; COSTA, V. B. M.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F.; BATISTA, L. M.; SOUZA, M. F. V. First secondary metabolites from *Herissantia crispa* L (Brizicky) and the toxicity activity against *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 48-50, 2009.

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

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; FERREIRA, S. H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 243–254, 2011.

DE SOUZA, M.M.; PEREIRA, M.A.; ARDENGHI, J.V.; MORA, T.C.; BRESCIANI, L.F.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.93, p.40-46, 2009.

DI ROSA, M.; D. A. WILLOUGHBY. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 23, n. 4, p. 297-8, 1971.

DECKER, M. W.; RUTER, L. E.; BITNER, R. S. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a potential new class analgesics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.4, n.3, p.369-384, 2004.

DOAK, G. J.; SAWYNOK, J. Complex role of peripheral adenosine in the genesis of the response to subcutaneous formalin in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 281, p. 311– 318, 1995.

EMA- European Medicines Agency. **Reflection Paper on Markers Used for Quantitative and Qualitative Analysis of Herbal Medicinal Products and Traditional Herbal Medicinal Products**. 2008. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003211.pdf. Acesso: 18 Jan. 2013.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system, **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1079–1095, 2002.

ESSER, M. J.; SAWYNOK, J. Caffeine blockade of the thermal antihyperalgesic effect of acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 399, p.131–139, 2000.

FAUCI, A. S.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L.; LOSCALZO, J. **Harrison Principios de Medicina Interna**. 17^a ed. McGraw-Hill Education, 2008.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 4, p. 429-436, 2010.

FERNANDES, B. H. P.; GOMES, C. R. G. Mecanismos e aspectos anatômicos da dor. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 237-246, 2011

FERREIRA, A. A.; AMARAL, F. A.; DUARTE, I. D. G.; OLIVEIRA, P. M.; ALVES, R. B.; SILVEIRA, D.; AZEVEDO, A. O.; RASLAN, D. S.; CASTRO, M. S. A. Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 148-153, 2006.

FLEMING, N. R. P.; GONÇALVES, O. R. Dor. In: LOPES, A. C. **Tratado de Clínica Médica**. 2. ed.. São Paulo, SP: Rocca, p. 2217-2224, 2009

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 671-674, 2005.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M. M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 157-164, 2001.

FRANCESCA, C.; ANGELO, A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.

FRANZOTTI, E. M.; SANTOS, C. V. F.; RODRIGUES, H. M. S. L.; MOURÃO, R. H. V.; ANDRADE, M. R.; ANTONIOLLI, A. R.; Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 273-278, 2000.

FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; LINDEN, J.; MULLER, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors- an update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1-34, 2011)

FRYXELL, P.A. New species and other notes in the Malvaceae. **Brittonia**, v. 25, n. 2, p. 77-85, 1973.

FRYXELL, P.A. Malvaceae. **Flora del Bajío y de regiones adyacentes**, v. 16, p. 1-176. 1993.

FRYXELL, P.A. The American genera of Malvaceae. II. **Brittonia**, v. 49, p. 204-269, 1997.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. Current drug targets. **Inflammation and allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, v. 15, p. 29-58, 2001.

GAUMOND, I.; SPOONER, M.F.; MARCHAND, S. Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. **Neuroscience**, v.146, p.366-374, 2007.

GILCHRIST, H. D., ALLARD, B. L., SIMONE, D. A. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. **Pain**, v. 67, p. 179–188, 1996.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 104-416, 2004.

GOMES, A. Y. S.; SOUZA, M. F. V.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Mechanism involved in the spasmolytic effect of a mixture of two triterpenes, cycloartenol and cycloeucalenol, isolated from *Herissantia tiubae* in the guinea-pig ileum. **Planta Medica**, v. 71, p. 1025-1029, 2005.

GÓMEZ ESTRADA, H.A.; GONZÁLEZ RUIZ, K.N.; MEDINA, J.D. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.10, p.182-217, 2011.

GONÇALVES, J. C. R., OLIVEIRA, F. S., BENEDITO, R. B., SOUSA, D. P., ALMEIDA, R. N. & ARAÚJO, D. A. M. A. D. Antinociceptive activity of (-)-Carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 31 p. 1017–1020, 2008.

GRISHAM, M.B.; JOURD'HEUILL, D.; WINK, D.A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.276, p. G315 - G321, 1999.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.A.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, p. 949-957, 2010.

HAJHASHEMI, V.; AMIN, B. Effect of glibenclamide on antinociceptive effects of antidepressants of different classes. **Clinics**, v. 66, p. 321-325, 2011.

HALL, J. C.; HEEL, K.A.; PAPADIMITRIOU, J. M.; PLATELL, C. The pathobiology of peritonitis. **Gastroenterology**, v. 114, p. 185-196, 1998.

HANADA, T; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine e Growth Factor Reviews**, v. 13, p. 413–421, 2002.

HARRIS, J. A.; WESTBROOK, R. F. Effects of benzodiazepine microinjection into the amygdala or periaqueductal grey upon the expression of conditioned fear and hypoalgesia in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 109, p. 295–304, 1995.

HELMS, J.E.; BARONE, C.P. Physiology and treatment of pain. **Critical Care Nurse**, v. 28, p. 38-49, 2008.

HENRY, J. L.; YASHPAL, K.; PITCHER, M. G.; CODERRE, T. J. Physiological evidence that the “interphase” in the formalin test is due active inhibition. **Pain**, v. 82, p. 57-63, 1999.

HERTOG, M. G., FESKENS, E. J.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. **Nutrition and Cancer**, v. 22, p.175-184, 1994.

HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants on the World**, Ed. B. T. Batsford Ltda.: London, 1993.

HUANG, G. J.; HUANG, S. S.; LIN, S. S.; SHAO, Y. Y.; CHEN, C. C.; HOU, W. C.; KUO, Y. H. Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of ergostatrien-3 β -ol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth in mice. **Journal of Cultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7445-7452, 2010.

HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. **Current Neuropharmacology**, v. 4, p. 197-206, 2006.

HUNSKAAR, S.; FASMAR, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-104, 1987.

HUK, I.; BROVKOVICH, V.; NANOBASH, V.; WEIGEL, G.; NEUMAYER, C.; PARTYKA, L.; PATTON, S.; MALINSKI, T. Bioflavonoid quercetin scavenge superoxide and increase nitric oxide concentration in ischaemia reperfusion injury: an experimental study. **British Journal of Surgery**, v. 85, p. 1080-1085, 1998.

IJEOMA, U. F.; ADERONKE, S. O.; OGBONNA, O.; AUGUSTINA, M. A.; IFEYINWA, C. N. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude extracts of *Ipomoea involucrata* leaves in mice and rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 121-124, 2011.

JAIN, K. D. Modulators of nicotinic acetylcholine receptors as analgesics. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v.5, n.1, 76-78, 2004.

JIN, W. Y.; LIU, Z.; LIU, D.; YU, L. C. Antinociceptive effects of galanin in the central nucleus of amygdala of rats, an involvement of opioid receptors. **Brain Research**, v. 1320, p. 16-21, 2010.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicin against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 632-637, 2007.

JOLY, A. B. Família Malvaceae. In: **Botânica - introdução à taxonomia vegetal**, 13^a ed.; Companhia Editora Nacional, p. 458-461, 2002

JONAVIC, S. V.; STEENKEN, S.; SIMIC, M. G.; HARA, Y. Antioxidant proprieties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. In: **Rice Evans C, Packer L. Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Deker; p 137-161, 1998.

JONES, P. G.; DUNLOP, J.. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. **Neuropharmacology**, v.53, n.2, p.197-206. 2007.

JONES, S. L. **Descending control of nociception. In the initial processing of pain and its descending control: spinal and trigeminal system**. P.L. Glidenberg (Ed.) Karger, Basel, p.203-295,1992.

JORGE, A. P. **Efeito insulino-mimético do canferol 3,7-O-(α)-L-diraminosídeo na glicemia e na captação da 2-[¹⁴C (U)]-deoxi-D-glicose em músculo sóleo de ratos**. Dissertação de Metrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

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

KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; KOREN, T.; SERTESER, M.; AKTEPE, F.; ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v. 183, p. 133-142, 2003.

KANEUCHI, M.; SASAKI, M.; TANAKA, Y.; SAKURAGI, N.; FUJIMOTO, S.; DAHIYA, B. Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. **International Journal of Oncology**, v. 22, n. 1, p. 159-164, 2003.

KHALID, M. H.; AKHTAR, M. N.; MOHAMAD, A. S.; PERIMAL, E. K.; AKIRA, A.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive effect of the essential oil of *Zingiber zerumbet* in mice: possible mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 345-351, 2011.

KLAUMANN, P. R. et al. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

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

KLIMENKO, N. A.; PAVLOVA, E. A. Role of Leukocytes in Increased Vascular Permeability in Inflammation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 128, n. 8, p. 800-802, 1999.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, p. 199-206, 2006.

KUPERS, R.; KEHLET, H. Brain imaging of clinical pain states: a critical review and strategies for future studies. **The Lancet Neurology**, v. 5, p. 1033-1044, 2006.

LAWRENCE, M. B.; SPRINGER, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell**, v. 65, p. 859-873, 1991.

LAZZARINI, R.; MAIORKA, P. C.; LIU, J.; PAPADOPOULOS, V.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: Role of nitric oxide. **Life Sciences**, v. 78, p. 3027-3034, 2006.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.

LIESVELD, J. L.; ABOUD, C. N.; LU, C.; MCNAIR, C.; MENON, A. Flavonoid effects on normal and leukemic cells. **Leukemia Research**, v. 27, p. 517-527, 2003.

LIMA, I. O. **Avaliação farmacológica do extrato metanólico bruto e da fase n-butanólica obtida da espécie *Herissantia crispa* (L.) Brizicky em modelos animais frente à atividade antiulcerogênica.** Dissertação de Mestrado. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica / UFPB / João Pessoa, Paraíba. 2008.

LIMA, I. O.; COSTA, V. B. M.; MATIAS, W. N.; COSTA, D. A.; SILVA, D. A.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; LIMA, E. O.; BATISTA, L. M. Biological activity of *Herissantia crispa* (L.) Brizicky. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 249-254, 2009.

LIMA, L. R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LIN, S. Y.; TSAI, S. J.; WANG, L. H.; WU, M. F.; LEE, H. Protection by quercetin against cooking oil fumes induced DM damage in human lung adenocarcinoma CL-3 cells: role of C. **Nutrition and Cancer**, v. 44, p. 95-101, 2002.

LIRA, S. R. S. **Efeitos farmacológicos do extrato etanólico de *Combretum leprosum* Mart. & Eicher sobre o sistema nervoso central.** Dissertação de Mestrado. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica / UFPB / João Pessoa, Paraíba. 2001.

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

LOPES, L.S.; MARQUES, R.B.; FERNANDES, H.B.; PEREIRA, S.S.; AYRES, M.C.C.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C. Mechanisms of the antinociceptive action of (-) Epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of *Combretum leprosum* Mart & Eich in rodents. **Journal of Biomedical Science**, v.19, p.68-74, 2012.

LOPES, L.S.; MARQUES, R.B.; PEREIRA, S.S.; AYRES, M.C.; CHAVES, M.H.; CAVALHEIRO, A.J.; VIEIRA JÚNIOR., G.M.; ALMEIDA, F.R.C. Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and (-) epicatechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, p.1184-1192, 2010.

LOPEZ-LOZARO, M. Flavonoids as anticancer agents. structure-activity relationship study. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 2, p. 691-714, 2002.

- MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**, v. 555, p. 62–65, 2003.
- MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA and its receptors in the spinal cord. **TIPS**, v. 17, p. 457–462, 1996.
- MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; CHAIN, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 25, p. 947-951, 1995.
- MARIOTTO, S., ESPOSITO, E.; DI PAOLA, R.; CIAMPA, A.; MAZZON, E.; DE PRATI, A. C.; DARRA, E. ; VINCENZI, S.; CUCINOTTA, G.; CAMINITI, R.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. **Pharmacology Research**, v. 57, n. 2, p. 110-24. 2008.
- MARK, M.D.; HERLITZE, S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5830–5836, 2000.
- MATIAS, W. N. **Estudos térmicos e validação de metodologia analítica para a padronização de extratos vegetais de *Herissantia crispa* L. Brizicky- Malvaceae.** Dissertação de Mestrado. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica / UFPB / João Pessoa, Paraíba, 2009.
- MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; SHIMODA, H.; YOSHIKAWA, M. Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): Structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 707-712, 2002.
- MAY, M. J.; WHEELER-JONES, C. P.; PEARSON, J. D. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on cytokine-induced adhesion molecule expression by human umbilical vein endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 7, p. 1761-1771, 1996.
- MCHALE, J. F.; HARARI, O. A.; MARSHALL, D.; HASKARD, D. O. TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3993-4000, 1999.
- MCKENNA, M. C. The glutamate–glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, v. 15, p. 3347–3358, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MELLER, S. T.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G.F. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**, v. 71, p. 327–335, 1996.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms**. 2^a. ed. Seattle: IASP Press, p. 210, 1994.

MICLESCU, A.; GORDH, T. Nitric oxide and pain: ‘Something old, something new’. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 53, p. 1107–1120, 2009.

MILES, A.; LIASKOU, E.; EKSTEEN, B.; LALOR, P.F.; ADAMS, D.H. CCL25 and CCL28 promote alpha4 beta7-integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, p. 1257-1267, 2008.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1 – 164, 1999.

MILTERSTEINER, A.; MILTERSTEINER, D.; PEREIRA-FILHO, N.; FROTA, A. R.; ELY, P. B.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, C. G.; MARRONI, N. P. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 232-237, 2003.

MIÑO, J.; ACEVEDO, C.; MOSCATELLI, V.; FERRARO, G.; HNATYSZYN, O. Antinociceptive effect of the aqueous extract of *Balbisia calycina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 179-182, 2002.

MITCHELL, R. N., KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. Adaptações celulares, lesão celular e morte celular. In: **Robbins e Cotran: fundamentos de patologia**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 3-28, 2006.

MOHAMAD, A. S.; AKHTAR, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; PERIMAL, E. K.; KHALID, S.; MOHD, P. A.; KHALID, M. H.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SULAIMAN, M. R.

Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 647, p. 103-109, 2010.

MORAES, D. S. C.; CAMARGO, E. A. Antidrepressivos e anticonvulsivos utilizados no tratamento da dor neuropática. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.77, p. 44-47, 1999.

MORTEZA-SEMNANI, K.; SAEEDI, M.; HAMIDIAN, M.; VAFAMEHR, H.; DEHPOUR, A. R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Glaucium grandiflorum* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 181-186, 2002.

MUROYA, K.; TERRÃO, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.

NAKATANI M, FUKUNAGA Y, HASE T: Two aliphatic enone ethers from *Hibiscus rosa-sinensis*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 449–452, 1986.

NANTEL, F., DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS; K. M.; CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.128, n. 4, p.853-9. 1999.

NAVARRO-GONZALEZ, J. F.; MORA-FERNANDEZ, C.; MUROS DE FUENTES, M.; GARCÍA-PÉREZ, J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 7, n. 6, p. 327-340, 2011.

NONATO, F. R.; NOGUEIRA, T. M. O.; BARROSA, T. A. A.; LUCCHESI, A. M.; OLIVEIRA, C. E. C.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam.: Evidence for a role of IL-1 inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 518– 524, 2011.

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

OLIVEIRA, F. S. **Estudo do efeito psicofarmacológico de hidroxicarvona em camundongos**. Dissertação de Mestrado. Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 466-476, 2007.

OLIVEIRA, F. S., SOUSA, D. P., ALMEIDA, R. N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 31 n. 4, p. 588—591, 2008.

OLIVEIRA, J. R. **Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato hidroalcoólico de folhas de *Cissampelos sympodialis***. Dissertação de Mestrado. Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Research**, v. 912, p. 171-175, 2001.

ONG, H. M.; MOHAMAD, A. S.; MAKHTAR, N. A.,;KHALID, M. H.; KHALID, S.; PERIMAL, E. K.; MASTUKI, S. N.; ZAKARIA, Z. A.; LAJIS, N.; ISRAF, D. A.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 227-233, 2011.

ORLANDI, L.; VILELA, F. C.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; DIAS, D. F.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1469– 1476, 2011.

OLSON, N.; VLIET, A. V. D. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 125-137, 2011.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the Colombia Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 233-241, 2000.

OYEMITAN, I. A.; IWALEWA, E. O.; AKANMU, M. A.; OLUGBADE, T. A. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil of *Dennettia tripetala* G.Baker (Annonaceae) in rodents. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 5, p. 355-362, 2008.

PALMEIRA, C.C.A.; ASHMAWI, H.A.; POSSO, I.P. Sexo e percepção da dor e analgesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 814-828, 2011.

PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.102, p.937-944, 2001.

PARADISE, W. A.; VESPER, B. J.; GOEL, A.; WALTONEN, J. D.; ALTMAN, K.W.; HAINES, G. K; RADOSEVICH, J. A Nitric oxide: perspectives and emerging studies of a well known cytotoxin. **Internacional Journal of Molecular Science**, v. 11, p. 2715–2745, 2010.

PASSOS, G. F., FERNANDES, E. S.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, 21, p.323-33. 2007.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; CHESSA, M. L.; MORETTI, M. D. L.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (–)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, p. 37-41, 2003.

PEREIRA, C. K. S. **Estudo da ação psicofarmacológica de *Herissantia crispa* (L.) Brizicky (Malvaceae)**. Dissertação de Mestrado. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica / UFPB / João Pessoa, Paraíba, 2009.

PEREIRA, C. K S.; OLIVEIRA, A. M. F.; PENHA, A. R. S.; TELES, Y. C. F.; MATIAS, W. N.; SOUZA1, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; ASSIS, T. S. Antinociceptive effect of the ethanol crude extract of *Herissantia crispa* (L.) Brizicky. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 47, p. 5813-5818, 2012.

PEREIRA, M. S. A. **Estudo da atividade antinociceptiva da adenosina em camundongos - análise do mecanismo de ação**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina, 2005.

PERES, W., TUÑÓN, M. J.; COLLADO, P. S.; HERRMANN, S.; MARRONI, N., GALLEG0, J. G. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **Journal of Hepatology**, v. 33, p. 742-750, 2000.

PLAPER, A.; GOLOB, M.; HAFNER, I.; OBLACK, M.; SOLMAJER, T., JERALA, R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 2, p. 530-536, 2003.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

PORFIRE, A.S.; PÂRVU, A.E.; DAICOVICIU, D.; LEUCUTA, S.E. Evaluation of antiinflammatory activity of liposome encapsulated superoxide dismutase in rats peritonitis. **Farmacia**, v.57, p.412-423, 2009.

POSADAS, I., BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G.. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-8, 2004.

QI, L. H.; KANG, L. P.; ZHANG, J. P.; SHI, N.; ZHANG, M.; WU, T. M. Antifibrotic effects of genistein and quercetin *in vitro*. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 9, p. 648-651, 2001.

QI, L. W.; WANG, C. Z.; YUAN, C. S. Ginsenosides from American ginseng: Chemical and pharmacological diversity. **Phytochemistry**, v. 72, p. 689–699, 2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; SIQUEIRA, J. S.; OLIVEIRA, L. E. G.; ALMEIDA, R. N.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with anticonvulsant properties - a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 798-819, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 592, 2007

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 60, p. 404–415, 2001.

ROCHA F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 631-639, 2007a.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S.; SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, p. 94-105, 2007.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACEDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p. 514-535, 2005.

ROGERS, H.; BIRCH, P. J.; HARRISON, S. M.; PALMER, E.; MANCHEE, G. R.; JUDD, D. B.; NAYLOR, A.; SCOPES, D. I.; HAYES, A. G. GR94839, a kappa-opioid agonist with limited access to the central nervous system, has antinociceptive activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 106, p. 783-789, 1992.

RAMEZANI, M.; HOSSINZADEH, H.; DANESHMAND, N. Antinociceptive effect of *Elaeagnus angustifolia* fruit seeds in mice. **Fitoterapia**, v. 72, p. 255-262, 2001.

ROSA, K. A.; GADOTTI, V. M.; ROSA, A. O.; RODRIGUES, A. L.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neuroscience Letters**, v. 381, p. 185-8, 2005.

RYLSKI, M.; DURIASZ-ROWINSKA, H.; REWERSKI, W. The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. **Acta Physiologica Polonica**, v. 30, n. 3, p. 385-388, 1979.

SALA, A.; RECIO, M. C.; SCHINELLA, G. R.; MANEZ, S.; GINER, R. M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. L. Assesment of the radical scavenger activity of tiliroside. **European Journal of Pharmacology**, v. 461, p. 53-61, 2003.

SALIBA, R.; HUBER, R.; PENTER, J.D. Pain control in small animals. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1981-1988, 2011.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829-838, 1996.

SAMUELSSON, G. Sesquiterpenoids and diterpenoids with pharmacological and biological activities. **Acta Pharmaceutica Fennica**, v. 101, p. 33-44, 1992.

SANDBORN, W.J.; YEDNOCK, T.A. Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin. **American Journal of Gastroenterology**, v. 98, p. 2372-2382, 2003.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-Trypanosoma cruzi. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17, p. 455-465, 2007.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 323-328, 1995.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 1-20, 2003.

SAWYNOK, J.; REID, A. R.; DOAK, G. J. Caffeine antinociception in the rat hot plate and formalin tests and locomotor stimulation: involvement of noradrenergic mechanisms. **Pain**, v. 61, p. 203-213, 1995.

SAWYNOK, J.; REID, A. R.; FREDHOLM, B. B. Caffeine reverses antinociception by oxcarbazepine by inhibition of adenosine A₁ receptors: insights using knockout mice. **Neuroscience Letters**, v. 473, p. 178-181, 2010.

SBED – **Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor**. 2009. Disponível em: <<http://www.dor.org.br/publico/impactos.asp>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

SCHEFFER, R. E. Psychopharmacology: Clinical implications of brain neurochemistry. **Pediatric Clinics of North America**, v. 53, p. 767-775, 2006.

SCHIMID, K. M.; PATTERSON, G. W. Distribution of cyclopropane noid fatty acids in Malvaceous plant parts. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2831-2834, 1988.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHNAKERS, C.; CHATELLE, C.; DEMERTZI, A.; MAJERUS, S.; LAUREYS, S. What about pain in disorders of consciousness? **AAPS Journal**, v. 14, p. 437-444, 2012.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 1062-1066, 2002.

SCHULTZ, A. R. **Introdução ao estudo da botânica sistemática**. 3ª ed. Globo: Porto Alegre, 1968.

SEHGAL, N.; SMITH, H.; MANCHIKANTI, L. Peripherally Acting Opioids and Clinical Implications for Pain Control. **Pain Physician**, v. 14, p. 249-258, 2011.

SERHAN, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? **Annual Review of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 1576-91, 2010.

SEZIK, E.; YESILADA, E.; TABATA, M.; HONDA, G.; TAKAISHI, Y.; FUJITA, T.; TANAKA, T.; TAKEDA, Y. Traditional medicine in Turkey. VIII. Folk medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Agri, Kars, Igdir provinces. **Economic Botany**, v. 51, p. 195–211, 1997.

SHAH, A. S.; ALAGAWADI, K. R. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties of *Thespesia populnea Soland* ex. Correa seed extracts and its fractions in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1504– 1509, 2011.

SHARMA, P. V.; AHMAD, Z. A. Two sesquiterpene lactones from *Abutilon indicum*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3525, 1989.

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

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

SHIEH, C. C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J. P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacology Reviews**, v. 52, p. 557– 594, 2000.

SHI, G.; LIU, Y.; LIN, H.; YANG, S.; FENG, Y.; REID, P. F.; QIN, Z. Involvement of cholinergic system in suppression of formalin-induced inflammatory pain by cobratoxin. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, p. 1233–1238, 2011.

SILVA, D. A.; CHAVES, M. C. O.; COSTA, D. A.; MORAES, M. R. R.; NÓBREGA, F. B. P.; SOUZA, M. F. V. Flavonoids from *Herissantia tiubae*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 197-200, 2005.

SILVA, D. A.; COSTA, D. A.; SILVA, D. F.; SOUZA, M. F. V.; AGRA, M. F.; MEDEIROS, I. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides

glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-*O*- α -L-ramnopiranosídeo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 23-29, 2005a.

SILVA, D. A.; FALCÃO-SILVA, V. S.; GOMES, A. Y. S.; COSTA, D. A.; LEMOS, V. S.; AGRA, M. F.; BRAZ-FILHO, R.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; SOUZA, M. F. V. Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5,49,-dihydroxy-3,6,7,8,39-pentamethoxyflavone as a modulator of bacterial drug resistance. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 128-133, 2009

SILVA, M. G.; OLIVEIRA, F. S.; DINIZ, M. F. F. M.; TAKEMURA, O. S. Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de *Conocliniopsis prasiifolia* R.M. King & H. Robinson na resposta celular de neutrófilos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 569-572, 2008.

SILVA, M. G.; OLIVEIRA, F. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; OLIVEIRA, T. M. L.; DINIZ, M. F. F. M.. Investigação do efeito analgésico central e antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em roedores. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, p. 533-537, 2005b.

SIMÕES, C. M. O; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas de medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1986.

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 7, p. 151-185, 2005.

SKELDON, A.; SALEH, M. The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 15, 2011.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

SOUSA, L. P.; LOPES, F.; SILVA, D. M.; TAVARES, L. P; VIEIRA, A. T.; REZENDE, B. M.; CARMO, A. F.; RUSSO, R. C.; GARCIA, C. C.; BONJARDIM, C. A.; ALESSANDRI, A. L.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a

PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 5, p. 895-904, 2010.

SOUTO, A .L.; TAVARES, J.F.; DA SILVA, M. S.; DINIZ ,M. F. F. M.; DE ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010. **Molecules**, v.16, p.8515-8534, 2011.

STADNYK, A.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. **Immunology Today**, v. 12, n. 3, p. 7-12, 1991.

STEIN, C.; ZOLLNER, C. Opioids and sensory nerves. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 194, p. 495-518, 2009.

STEVENS, P. F. 2003. **Angiosperm phylogeny website**. <http://www.mobot.org>. Acessado em maio de 2003.

STEWART, M.; THIEL, M.; HOGG, N. Leukocyte integrins. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 690-6, 1995.

SULAIMAN, M. R.; HUSSAIN, M. K.; ZAKARIA, Z. A.; SOMCHIT, M. N.; MOIN, S.; MOHAMAD, A. S.; ISRAF, D. A. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ficus deltoidea* aqueous extract. **Fitoterapia**, v. 79, p. 557–561, 2008.

SUTRADHAR, R. K.; RAHMAN, A. M.; AHMAD, M; BACHAR, S. C.; SAHA, A.; GUHA, S. K. Bioactive alkaloid from *Sida cordifolia* Linn. with analgesic and anti-inflammatory activities. **Iranian Journal of Pharmacology e Therapeutics**, v. 5, p. 175-178, 2006.

SZEKANECZ, Z.; SZÜCS, G.; SZÁNTÓ, S.; KOCH, A.E. Chemokines in rheumatic diseases. **Current Drug Targets**, v. 7, p. 91-102, 2006.

TAHER, Y. A. Antinociceptive activity of *Mentha piperita* leaf aqueous extract in mice. **Libyan Journal of Medicine**, v.7, p.1-5, 2012.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Direct cutaneous hyperalgesia induced by adenosine. **Neuroscience**, v. 38, p. 757–762. 1990.

THEOHARIDES, T. C.; ALEXANDRAKIS, M.; KEMPURAJ, D.; LY TINAS, M. Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new desing.

International Journal of Immunopathology and Pharmacology, v. 14, n. 3, p. 119-127, 2001.

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

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neuron Review**, v. 55, p. 377-391, 2007.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, p. 19-26, 2002.

VALE, F.M. Dor. Novos aspectos fisiopatológicos e consequentes estratégias farmacológicas. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 5, p. 291-304, 2000.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**, v. 91, p. 1-12, 2007.

VANE, J .R.; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflammation Research**, v.47, p.78-87, 1998.

VAZ, Z. R.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociceptive in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304-312, 1996.

VENÂNCIO, A. M. **Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), em *mus Musculus* (camundongos)**. Dissertação do Mestrado. Universidade Federal de Sergipe, Aracajú, SE, 2006.

VENKATESH, S.; REDDY, S. R.; SURESH, B.; RESSY, B. M.; RAMESH, M. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sida rhomboidea* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 229-232, 1999.

VICKERY, J. R. The Fatty Acid Composition of Seed Oils from Ten Plant Families with Particular Reference to Cyclopropene and Dihydrosterculic Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, p. 87-91, 1980.

VIDYALAKSHMI, K.; KAMALAKANNAN, P.; VISWANATHAN, S.; RAMASWAMY, S. Antinociceptive effect of certain dihydroxy flavones in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, p.1-6, 2010.

VILELA-FILHO, O. Dor: anatomia funcional, classificação e fisiopatologia. **Jovem Médico**, v. 2, p. 125-132, 1998.

VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 642-654, 2008.

WADA, Y.; YAMASHITA, T.; IMAI, K.; MIURA, R.; TAKAO, K.; NISHI, M.; TAKESHIMA, H.; ASANO, T.; MORISHITA, R.; NISHIZAWA, K.; KOKUBUN, S.; NUKADA, T. A region of the sulfonylurea receptor critical for modulation of ATP-sensitive K⁺ channels by G-protein hg-subunits. **EMBO Journal**, v. 19, p. 4915- 4925, 2000.

WANG, H. K. The therapeutic potential of flavonoids. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, p. 2103-2119, 2000.

WILDER-SMITH, C. H. Predicting pain and pain responses to opióides. **European Journal of Pain Supplements**, v. 1, p 31–37, 2007.

WILLAIN-FILHO, A. **Potencial analgésico de flavonóides: estudo do mecanismo de ação da quercetina**. Dissertação do Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

WIRTH, K.. J.; ALPERMANN, H. G.; SATOH, R.; INAZU, M. The bradykininantagonist Hoe 140 inhibits carrageenan- and thermically induced paw oedema in rats. **Agents and Actions Supplement**, v.38, p.428-431, 1992.

WITKAMP, R.; MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 11-6, 2000.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1769, 2000.

WU, W. P.; HAO, J. X.; HALLDNER, L.; LÖVDAHL, C.; DELANDER, G. E.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; FREDHOLM, B. B.; XU, X. J. Increased nociceptive response in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Pain**, v. 113, p. 395-404, 2005

YESILADA, E.; GÜRBÜZ, I. A. **Compilations of the studies on the anti-ulcerogenic effects of medicinal plants**. Recent progress in medicinal plants, SCI Tech Publishing LLC: Houston, 2002.

YESILADA, E.; KUŞPELİ, E. *Clematis vitalba* L. aerial part exhibits potent antiinflammatory, antinociceptive and antipyretic effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 504–515, 2007.

ZEILHOFER, H.U.; WILDNER, H.; YÉVENES, G.E. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. **Physiological Reviews**, v. 92, p. 193-235, 2012.

Anexos



