

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

**ADRIANO FRANCISCO ALVES**

**MILONINA, ALCALOIDE DE *CISSAMPELOS SYMPODIALIS* EICHL.  
(MENISPERMACEA) INIBE INFLAMAÇÃO AGUDA MEDIADA POR  
MASTÓCITO.**

João Pessoa - PB

2016

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

**ADRIANO FRANCISCO ALVES**

**MILONINA, ALCALOIDE DE *CISSAMPELOS SYMPODIALIS* EICHL.  
(MENISPERMACEA) INIBE INFLAMAÇÃO AGUDA MEDIADA POR  
MASTÓCITO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Piuvezam.

João Pessoa - PB

2016

A474m Alves, Adriano Francisco.  
Milonina, alcaloide de *cissampelos sympodialis* EICHL.  
(Menispermaceae) inibe inflamação aguda mediada por  
mastócito / Adriano Francisco Alves.- João Pessoa, 2016.  
107f. : il.  
Orientadora: Márcia Regina Piuvezam  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS  
1. Produtos naturais. 2. *Cissampelos sympodialis*.  
3. Milonina. 4. Inflamação. 5. Mastócito.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

**MILONINA, ALCALOIDE DE *CISSAMPELOS SYMPODIALIS* EICHL.  
(MENISPERMACEA) INIBE INFLAMAÇÃO AGUDA MEDIADA POR  
MASTÓCITO.**

Adriano Francisco Alves

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Piuvezam (**Orientadora**)  
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatjana Keesen de Sousa Lima Clemente  
(Centro de Biotecnologia – UFPB. Avaliador Interno)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janeusa Trindade de Souto  
(Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFRN. Avaliador Externo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Rodrigues Mascarenhas  
(Centro de Biotecnologia – UFPB. Suplente)

Dedico esse trabalho a minha família, minha irmã, minha sobrinha e ao meu grande amigo Ícaro.

## AGRADECIMENTOS

**À Deus**, pela força cotidiana e a vontade de continuar. Por ter me dado uma família que me ama e por me ter feito chegar até o fim.

**À minha família**, porque sem ela nada disso teria acontecido. Em especial a minha irmã, **Andréa**, que sempre me amou como um filho e a minha sobrinha linda **Gisele**, que sempre me ajuda a relaxar me chamando para brincar e tocar para ela dançar.

**Aos meus amigos**, todos eles, os da igreja, os mais íntimos como Rosiane e Weverson. E especialmente a **Ícaro**, meu grande amigo que sempre me ajudou a continuar e ir em busca dos meus sonhos.

**À minha turma da graduação**, especialmente Sandra e Priscylla, que sempre me apoiaram perguntando sempre: “Como é que tu aguenta essa vida hein..?!”

**À minha turma de mestrado** por termos passado juntos por todas as dificuldades, em especial a Igor, Renan, Denise e Danielle. Fui luta, mas já ta acabando!!

**À minha grande orientadora**, Márcia, por tanto incentivo, motivação, despertar do senso crítico. Você é uma orientadora excelente profa.

**Aos integrantes do laboratório** de imunofarmacologia, a todos IC's, mestrandos e doutorandos. Especialmente a Allysson e Raquel que me ajudaram na confecção das lâminas histológicas, Geovania, Larissa, e Luiz truque que sempre me ajudou em tudo que precisei. MUITO OBRIGADO!

**À todos os professores** do programa por tudo o que foi ensinado.

**Aos funcionários e técnicos** do laboratório, em especial a Crispim pela ajuda com os animais e a Mônica pela sua alegria contagiante.

**À Universidade Federal da Paraíba**, pela viabilidade técnica fundamental ao desenvolvimento de minhas atividades.

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

**Enfim, à todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.**

**Obrigado à todos!**

Agrada-te do Senhor e ele satisfará os desejos do seu coração. Sl 37:4

## RESUMO

A planta *Cissampelos sympodialis* EICHL. (Menispermaceae) é uma planta nativa da região paraibana a qual é utilizada na medicina popular para tratamento de diversas afecções inflamatórias, como asma e rinite. Essa planta apresenta vários metabólitos biologicamente ativos como a warifteína, metil-warifteína, milonina, entre outros. Dados preliminares mostram que metabólitos como warifteína apresenta atividade anti-inflamatória em modelo murino de asma. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a milonina, metabólito de *Cissampelos sympodialis* apresenta atividade anti-inflamatória aguda. Para isso, utilizou-se modelos animais de edema de pata induzido por agentes flogísticos, análise histológica, choque anafilático, *scratching behaviour* e testes de atividade antinociceptiva, tais como, contorções abdominais e da placa quente. O pré tratamento dos animais com milonina foi capaz de inibir de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o edema de pata induzido por carragenina no período entre uma e duas horas enquanto que, no desafio com o composto 48/80, a milonina foi capaz de inibir ( $p < 0,05$ ) o edema nos dois tempos avaliados isto é 30 e 60 min. A milonina a 2mg/kg foi capaz de proteger em 75% os animais da morte induzida pelo composto 48/80 no teste de choque anafilático. Na análise morfológica da pele dos animais submetidos ao comportamento de coceira induzido pelo composto 48/80 observou-se a preservação das estruturas epiteliais. Em adição, a milonina foi capaz de diminuir de forma significativa ( $p < 0,05$ ), a nocicepção induzida por ácido acético e placa quente um padrão de inibição de dor inflamatória. Diante disso esses dados sugerem que a milonina apresenta atividade anti-inflamatória aguda via inibição da ação de mastócitos.

**Palavras-chaves:** *Cissampelos sympodialis*, milonina, inflamação, mastócito.

## ABSTRACT

*Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) is a native plant of Paraíba region which is used in folk medicine to treat various inflammatory conditions such as asthma and rhinitis. This plant has several biologically active metabolites such as warifteine, methyl warifteine, milonine, among others. Preliminary data show that warifteine exhibits anti-inflammatory activity in a murine model of asthma. The aim of this study was to evaluate whether milonina, metabolite of *Cissampelos sympodialis* has acute anti-inflammatory activity. For this purpose, we used the model of paw edema induced by phlogistic agents, histological analysis, anaphylactic shock reaction, scratching behavior and antinociceptive activity tests such as writhing and hot plate. The pretreatment of animals with milonina was able to inhibit significantly ( $p < 0.05$ ) paw edema induced by carrageenan in the period between one and two hours while the challenge with compound 48/80, the milonina was capable of inhibiting ( $p < 0.05$ ) the edema at two times 30 and 60 min. The milonina at 2mg / kg was able to protect 75% of animals from death induced by compound 48/80 in anaphylactic shock test. The morphological analysis of the skin of animals subjected to the itch behavior induced by compound 48/80 showed preservation of epithelial structures. In addition, milonina was able to decrease significantly ( $p < 0.05$ ), nociception induced by acetic acid and hot plate a pattern of the inhibition of inflammatory pain. Thus, these data suggest that milonina has acute anti-inflammatory activity via inhibition of mast cell action.

**Keywords:** *Cissampelos sympodialis*, milonine, inflammation, mast cells.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Análise histopatológica da milonina sobre o edema de pata induzido por composto 48/80 53
- Figura 2 Análise histopatológica da pele de animais pré tratados com milonina ou PBS submetidos ao modelo experimental de *scrating behaviour* 59
- .

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características e Funções dos Grânulos dos Mastócitos	29
Tabela 2	Efeito do tratamento oral com a milonina sobre a reação de choque anafilático induzida por composto 48/80	56

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Efeito do tratamento oral com a milonina sobre o edema de pata induzido por carragenina	49
Gráfico 2	Efeito do tratamento oral com a milonina sobre o edema de pata induzido por composto 48/80	50
Gráfico 3	Efeito do tratamento oral com a milonina sobre o edema de pata induzido por histamina	51
Gráfico 4	Análise histopatológica da milonina sobre o edema de pata induzido por composto 48/80	54
Gráfico 5	Efeito do tratamento oral com a milonina em modelo experimental de <i>scratching behaviour</i> .	57
Gráfico 6	Análise histopatológica da pele de animais pré tratados com milonina ou PBS submetidos ao modelo experimental de <i>scratching behaviour</i>	60
Gráfico 7	Efeito do tratamento oral com a milonina em modelo experimental de contorção abdominal induzida por ácido acético	61
Gráfico 8	Efeito do tratamento oral da milonina no teste da placa quente	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
B1, B2	Receptores da bradicinina
$\beta$ -hex	$\beta$ hemoxidase
CD	Classe de diferenciação
CCL20	Ligante de quimiona 20
CpG	Oligodesoxinucleotídeo
DAMPs	Dangerous associated a molecular patern
DCs	Células dendríticas
GM-CSF	Fatos estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
HCL	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina&Eosina
INF- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IgE	Imunoglobulina E
i.p.	Intraperitoneal
i.m.	Intramuscular
Kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1/CCL2	Proteína 1 quimioatraente para monócito
MCT	Mastócito que contem apenas triptase
MCC	Mastócito que contem apenas quimases
MCTC	Mastócito que contem quimases e triptases
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mg	Miligramas
NaCl	Cloreto de sódio

NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PLD	Fosfolipase D
PMN	Polimorfonuclear
PBS	Tampão fosfato de sódio
SCF	Stem cell factor
TLRs	Receptores tipo <i>TOLL</i>
TGF- $\beta$	Fator transformador do crescimento $\beta$
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
v.o	Via oral
V-Snare	Proteína de vesícula
$\mu$ l	microlitro
$\mu$ M	micromolar

## SUMÁRIO

<b>1.0 – INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 - O PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	19
1.2 - ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES NA INFLAMAÇÃO AGUDA .....	21
1.3 - VISÃO GERAL DOS MASTÓCITOS .....	22
1.4 - MASTÓCITOS E O PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	28
1.5 - ALCALOIDES: IMPORTÂNCIA FARMACOLÓGICA .....	33
1.6 - <i>CISSAMPELOS SYMPODIALIS</i> EICHL. (MENISPERMACEAE) .....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	39
2.1 GERAL .....	39
2.2 ESPECÍFICOS .....	39
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
3.1. LOCAL DA PESQUISA .....	41
3.2. OBTENÇÃO DA MILONINA .....	41
3.3. ANIMAIS .....	41
3.4. TRATAMENTO DOS ANIMAIS .....	42
3.5. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR AGENTES FLOGÍSTICOS: CARRAGENINA, COMPOSTO 48/80 OU POR HISTAMINA .....	42
3.6. COLETA DE TECIDO E MORFOMETRIA .....	43
3.7. REAÇÃO DE CHOQUE ANAFILÁTICO INDUZIDA PELO COMPOSTO 48/80 .....	44
3.8. INDUÇÃO E AVALIAÇÃO DO <i>SCRATCHING BEHAVIOR</i> (PRURIDO) .....	44
3.9. TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO .....	45
3.10. TESTE DA PLACA QUENTE .....	45
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	46
<b>4.0. RESULTADOS</b> .....	48
4.1. EFEITO DA MILONINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA. ....	48
4.2. EFEITO DA MILONINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80 .....	50
4.3. EFEITO DA MILONINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR HISTAMINA. ....	51

4.4. ANÁLISE HISTOPATOLOGICA DA MILONINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80.....	52
4.5. EFEITO DA MILONINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CHOQUE ANAFILÁTICO INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80. ....	55
4.6. EFEITO DA MILONINA EM MODELO EXPERIMENTAL <i>SCRATING BEHAVIOUR</i> (COCEIRA) INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80. ....	57
4.7. ANÁLISE HISTOPATOLOGICA DA MILONINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE <i>SCRATING BEHAVIOUR</i> (PRURIDO) INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80.....	58
4.8. EFEITO DA MILONINA NO TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO.....	61
4.9. EFEITO DA MILONINA NO TESTE DA PLACA QUENTE. ....	62
<b>5.0 DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>6.0 CONCLUSÃO</b> .....	78
<b>7.0 – REFERÊNCIAS</b> .....	80
<b>8.0 - ANEXOS</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

# ***INTRODUÇÃO***

---

## **1.0– INTRODUÇÃO**

### **1.1 - O PROCESSO INFLAMATÓRIO**

A inflamação se caracteriza como uma resposta fisiológica complexa que ocorre em tecidos vivo-vascularizados, contra produtos oriundos de patógenos, como os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), como vírus, bactérias, fungos, parasitas ou moléculas ou estruturas moleculares liberadas ou produzidas por células sob estresse que geram danos teciduais como os padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como as proteínas de choque térmico e, se caracteriza pela saída de líquidos e células dos vasos para o tecido lesado podendo culminar com a restauração do tecido (MEDZHITOV, 2010).

Os sintomas clínicos da inflamação foram definidos pela primeira vez pelo médico romano Cornelius Celsus no século I. Estes sintomas vieram a ser conhecidos como os quatro sinais cardinais, ou clínicos, da inflamação: rubor, tumor, calor e dor (MEDZHITOV, 2010). No entanto, o quinto sinal cardinal, perda da função, foi adicionado por Rudolph Virchow, 18 séculos depois, em 1858, em seu livro *Cellular Pathologie* (MEDZHITOV, 2010).

Os eventos inflamatórios podem ser divididos em padrões agudo e crônico. A inflamação é considerada aguda quando apresenta duração relativamente curta e é auto limitada podendo durar minutos, horas ou alguns dias, e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido plasmático rico em proteínas e migração de células para o local da lesão. Já a inflamação crônica apresenta maior tempo de duração e está histologicamente associada à presença de linfócitos e de macrófagos, angiogênese (proliferação de vasos sanguíneos), fibrose e necrose tecidual (SHERWOOD, E. R;TOLIVER-KINSKY, 2004).

Uma grande variedade de eventos, incluindo danos mecânicos, infecções, lesões químicas, queimaduras, radiação e injúria tecidual, podem induzir a inflamação aguda (SCHMID-SCHONBEIN, 2006), a qual tem um papel fisiológico importante na defesa do hospedeiro levando ao processo de reparo tecidual, que pode ser regeneração ou cicatrização levando a

homeostasia tecidual. Porém, quando esse processo é exacerbado pode levar à lesão tecidual e evoluir para um processo crônico, podendo ocasionar várias doenças, como: câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, pulmonares, neurológicas, entre outras (PORTH, 2010). Para que isto não ocorra, é necessário controlar o processo inflamatório à tempo, pela eliminação ou parada dos eventos que acontecem nesse processo, como o infiltrado celular que geram produtos potencialmente tóxicos e a vasodilatação.

O processo inflamatório agudo é iniciado a partir da ativação de células teciduais (macrófagos) e migratórias (neutrófilos). Células fagocíticas incluindo macrófagos teciduais, neutrófilos e monócitos circulantes desenvolvem importante papel na resposta inflamatória aguda. Estas células produzem os mediadores pró-inflamatórios (MATZINGER, 1994) os quais atuam localmente e/ou sistematicamente colaborando para o aparecimento dos sinais cardinais característicos do processo inflamatório agudo os quais podem ser acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA e SILVA, 1994). Estes, são gerados no local da lesão tais como, o Fator de Necrose Tumoral ( $TNF\alpha$ ), a Interleucina-1beta ( $IL1\beta$ ), prostaglandinas (PGs), cininas e componentes intracelulares, como o ATP (trifosfato de adenosina), além de citocinas, tais como interferon- $\gamma$  ( $IFN-\gamma$ ), IL-6, IL-12, entre outras. (VESTWEBER, 2015).

Os vários mediadores inflamatórios normalmente atuam restringindo as consequências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente os sinais cardinais localmente. Entretanto, dependendo da persistência e/ou intensidade da lesão, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticoides, alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de metais como ferro, cobre e zinco. Esta resposta sistêmica é denominada reação de fase aguda e nessas situações pode-se observar que o sistema nervoso central e imune estão funcionalmente conectados e integrados, já que nessa fase as citocinas produzidas no sítio inflamatório interagem com o sistema nervoso central, gerando por exemplo, febre, a qual é resultante da ação de citocinas como a  $IL-1\beta$  e do  $TNF-\alpha$  no hipotálamo (MOON et. al., 2014).

## **1.2 - ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES NA INFLAMAÇÃO AGUDA**

O conjunto de células que migram para o sítio inflamatório agudo durante o processo inicial da inflamação é constituído principalmente de neutrófilos e de monócitos (INGERSOLL et al., 2011).

Os neutrófilos, em humanos, constituem cerca de 50-70 % dos leucócitos no sangue periférico e circulam por cerca de 10 horas e depois morrem. Eles patrulham os vasos sanguíneos e, na presença dos sinais inflamatórios, os neutrófilos deixam de circular e migram para os tecidos inflamados pelo processo de diapedese ou transmigração, sendo as primeiras células a extravasarem para os sítios inflamatórios (CHOI et al., 2009). Os neutrófilos, juntamente com eosinófilos e basófilos, pertencem ao grupo de leucócitos denominados granulócitos, uma vez que contêm grânulos intracelulares. Os neutrófilos são também chamados de polimorfonucleares (PMN), devido ao seu núcleo segmentado ser dividido em vários lóbulos (PORTH, 2010).

A migração e acúmulo contínuo de neutrófilos nos tecidos é uma característica de condições inflamatórias agudas e crônicas, tais como glomerulonefrite, doença inflamatória intestinal, vasculite autoimune, dermatite e artrite reumatoide (LARSEN et al., 2009).

Os monócitos ao chegarem nos tecidos extra vasculares se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas inflamatórias, por isso, estas células são comumente denominadas derivadas de monócitos (GEISSMANN et al., 2010). A diferenciação dos monócitos em macrófagos é influenciada por eventos de adesão durante o extravasamento e por mediadores presentes no sítio inflamado (SUDHAKARAN et al., 2007). Essas células, em humanos, correspondem cerca de 5 a 10 % dos leucócitos periféricos circulantes e se desenvolvem na medula óssea, circulam no sangue periférico e migram para o tecido inflamado mediante a presença de estímulos tais como a quimiocina CCL-2 ou proteína-1 quimiotática do monócito (MCP-1) (CHOI et al., 2009).

No processo inflamatório, os macrófagos inflamatórios possuem três funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação por meio da produção de várias citocinas e fatores de crescimento, desempenhando papéis fundamentais na iniciação, manutenção e resolução do

processo inflamatório como a fagocitose de restos celulares e proteicos somados à secreção de citocinas como o Fator Transformador do Crescimento (TGF- $\beta$ ) que estimula a proliferação de fibroblastos (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005).

A inflamação, portanto, tem como função proteger uma região definida do tecido infectado ou danificado para inibir a progressão da lesão, isolando a área e evitando a disseminação do agente infectante ou de produtos celulares tóxicos aos tecidos. Uma vez a inflamação sendo resolvida, a função tecidual é restaurada ao normal levando o tecido à homeostase. Contudo, caso o agente infeccioso ou os produtos celulares continuarem presentes desenvolver-se-á uma inflamação crônica (MONTELEONE, 2011).

Em paralelo a essas células que migram, existem no tecido conjuntivo células fixas que são importantes no processo inflamatório como os mastócitos, os quais apresentam distribuição ampla e encontram-se predominantemente na interface entre o indivíduo e o ambiente externo, ou seja, nas mucosas e pele. Sua maturação, fenótipo e função são consequências diretas do microambiente local e têm uma influência marcada em sua capacidade de reconhecer e responder especificamente a vários estímulos pela liberação de uma série de mediadores biologicamente ativos (MARSHALL, 2004). Essas características permitem que mastócitos sejam células que atuem tanto como primeiros “guardas” em situações prejudiciais, bem como para responder a mudanças em seu ambiente pela comunicação com uma variedade de outras células implicadas nas respostas fisiológicas e imunológicas, liberando vários mediadores (METZ M, et. al., 2008).

### **1.3- VISÃO GERAL DOS MASTÓCITOS**

Descrita pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1878, os mastócitos foram considerados, na sua maior parte, como células efetas em processos alérgicos, particularmente as fases precoces (sensibilização) e agudas das reações alérgicas. As primeiras pesquisas sobre essas células dependiam de recursos morfológicos para identificar e mostrar a sua distribuição e localização em estados fisiológicos e patológicos. As características dessa célula foram identificadas gradualmente por Ehrlich, como a metacromasia e a presença de

grânulos, que estavam relacionados com nutrição dos tecidos circundantes. Em 1937, Holmgren e Willander observaram pela primeira vez que os tecidos que exibiam um grande número de "*Ehrlichschen Mastzellen*" (mastócitos) possuíam altas concentrações de heparina. Os 15 anos seguintes testemunharam o estabelecimento de uma relação entre o mastócitos, histamina, e anafilaxia, o qual foi suportado pela descoberta de que a histamina estava presente em mastócitos (RILEY E WEST, 1952) e que essas substâncias, histamina e heparina, eram lançadas juntas nos tecidos durante choque anafilático (ROCHA E SILVA 1947).

Em 1967, Ishizaka e Ishizaka identificaram a IgE como o anticorpo capaz de desencadear respostas de hipersensibilidade imediata. Posteriormente, verificou-se que a IgE era capaz de mediar a liberação de histamina e outras substâncias a partir de mastócitos do tecido sensibilizado (ISHIZAKA et al. 1970). Essas descobertas abriram o caminho para que os mastócitos se tornassem famosos por seu papel na hipersensibilidade imediata do tipo I.

A origem de mastócitos foi um mistério sem solução por décadas. A maioria das outras células hematopoiéticas são liberadas no sangue em um estado maduro identificável. No entanto, os mastócitos são células derivadas da medula óssea, a partir de mastócitos pró-genitores (MCP-mast cell progenitor), os quais passam por uma série de transformações até se transformar em uma célula adulta, que expressa o receptor CD117(c-Kit), seguido do FcεRI (DAHLIN E HALLGREN, 2015).

Os estudos realizados em roedores, primatas e humanos indicaram que muitos aspectos do desenvolvimento de mastócitos e sua sobrevivência são criticamente reguladas pelo fator de células estaminais (SCF –*stem cell factor*), além da participação da tirosina como ligante em receptores expressos na superfície de mastócitos que levam a proliferação dessas células (WEDEMEYER, 2000).

Outras citocinas e fatores de crescimento que regulam o desenvolvimento de mastócitos e sua diferenciação incluem IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10. Os mastócitos começam a expressar o receptor de alta afinidade para a imunoglobulina E (FcεRI) no início de seu desenvolvimento (GALLI S., 1999).

Os mastócitos derivam de células pluripotenciais da medula óssea que expressam o antígeno CD34 (FRANCO, et. al, 2010) e iniciam sua

diferenciação sob a influência do fator de células tronco - células estaminais (SCF) e da IL-3 (DAHLIN, et. al., 2012, 2013) de uma linhagem distinta dos monócitos e macrófagos e dos precursores dos granulócitos (SCOTT et. al., 1994). Em mastócitos murinos e humanos a aquisição de receptores de superfície e componentes intracelulares que caracterizam essas células como maduras ou totalmente diferenciadas, ocorre por um processo gradual realizado principalmente pelo SCF que se liga ao receptor tirosina-quinase c-kit expresso na membrana dos mastócitos (WEDEMEYER e GALLI, 2000). O SCF é produzido por células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais e age em conjunto com diversas citocinas (ARINOBU, et. al., 2005) como IL-3, IL-4, IL-9, IL-10 e fator de crescimento neural (NGF, *nerve growth factor*) (METCALFE, et. al., 1997). Os mastócitos são expostos continuamente ou sequencialmente a esses fatores de crescimento (GALLI, 1999). Além de expressarem o receptor c-kit, os mastócitos expressam FcεRI e FcγRII/III nos estágios iniciais de desenvolvimento antes de exibirem a maturação granular completa para serem reconhecidos morfológicamente (METCALFE, et. al., 1997).

Os precursores dos mastócitos migram da circulação para os tecidos periféricos, onde se relacionam intimamente com vasos sanguíneos e linfáticos, nervos periféricos e superfícies epiteliais (COLLMANN , et. al., 2013). Nesses locais, expressam o fenótipo final sob a influência do SCF e outras citocinas localmente produzidas como IL-3, IL-4, IL-9 e IL- 10 (METCALFE, et. al., 1997). A maturação dos mastócitos é altamente dependente dos fatores microambientais produzidos pelos tecidos nos quais eles residem (METCALFE, et. al., 1997).

Os mastócitos são encontrados particularmente em torno dos vasos sanguíneos, em estreita proximidade com os nervos periféricos, e sob superfícies epiteliais que estão expostos ao ambiente externo, tais como aqueles dos sistemas respiratório e gastrointestinal e da pele (BENOIST E MATHIS, 2002).

Os mastócitos de roedores podem ser classificados com base em diferenças fenotípicas em: mastócitos do tecido conjuntivo, isto é, pele e cavidade peritoneal e mastócitos da mucosa, isto é, células da lâmina própria intestinal (METCALFE et al., 1997). Ambos os subtipos de mastócitos diferem na sua função.

Da mesma forma mastócitos humanos também podem ser categorizados em dois diferentes subtipos, dependendo da presença de diferentes proteases e grânulos (IRANI et al., 1986), os quais compreendem o componente muito importante de grânulos de mastócitos para a sua medição quantitativa (ou seja proteases neutras associada a granulares são encontradas apenas em mastócitos) (HOLOGATE et al, 1988; METCALFE et al, 1997). Assim, os mastócitos humanos diferenciam-se no seu teor de protease e podem ter diferentes níveis de várias proteases (ou seja, triptase, quimase, ou a carboxipeptidase) (SCHWARTZ et al, 1993; PEJLER et al, 2009).

Células contendo apenas triptase são denominadas de MCT ao passo que os mastócitos com única quimase são chamadas de células MCC e mastócitos tanto com triptase como quinase são conhecidos como MCTC. MCT são particularmente abundantes em septos alveolares de pulmões e na mucosa do intestino delgado, enquanto MCTC estão presentes em grande quantidade especialmente na pele e na submucosa do intestino delgado (SCHWARTZ et. al, 1993; VLIAGOFTIS e BEFUS, 2005). No entanto, o MCC foi identificado como terceiro tipo de mastócito e está localizado principalmente na submucosa e mucosa do estômago, submucosa intestinal e mucosa do cólon (IRANI E SCHWARTZ, 1994).

Mastócitos são frequentemente caracterizados pela sua capacidade de liberarem uma grande variedade de mediadores importantes com uma diversidade de atividades biológicas já descritas (MOON, 2014). As descargas regulares de peptídeos, aminas, lipídios, e até mesmo alguns gases dependem de várias vias moleculares: na via principal ocorre liberação de grandes vesículas (grânulos) por exocitose regulada (desgranulação); outras vias dependente da síntese *de novo* de mediadores que envolvem um complexo tráfego de vesículas de reciclagem, incluindo a secreção constitutiva, via exosomal e endossomais; e outras vias secretoras que não são dependentes de vesículas ou porções ligadas à membrana, por exemplo, gases tais como o óxido nítrico (NO) que são liberados por difusão, já os mediadores lipídicos a partir de corpos lipídicos, que são liberados pela compatibilidade de membranas (LANCASTER, 1997).

A exocitose constitutiva dos grânulos ocorre na ausência de estímulos e o tráfico de vesículas secretoras para a membrana plasmática pode ocorrer

durante todo o tempo de vida de uma célula (LACY, 2011). Entretanto, a exocitose regulada, ou por estímulo, ocorre depois de um estímulo claramente definido, quer por alterações no ambiente extracelular, como: temperatura (MORI, 2000), pH (ALFONSO, 2000), a radiação (MULLER, 2011), a osmolaridade (GULLIKSSON, 2006) ou de uma ligação e ativação de receptor (WERNERSSON, 2014).

Os grânulos citoplasmáticos dessas células são elétron densos e contêm aminas biogênicas (histamina, serotonina) (SCHWARTZ, et. al., 1981), serina e várias outras proteases, por exemplo, triptases, além de membros da família S1 (serinas) (PRSS) (STRIK, et. al., 2007), quimase-1, captepina G, granzima B, e carboxi peptidase (MILLER, et. al., 1989; STRIK, 2007); enzimas lisossomais como a  $\beta$ -glucuronidase (SCHWARTZ, et., al., 1981),  $\beta$ -hexosaminidase ( $\beta$ -hex) (SCHWARTZ, et., al., 1981), aril sulfatases (SCHWARTZ, et. al., 1981) além de algumas citocinas como o TNF (OLSZEWSKI, et. al., 2007), a IL-4 (WILSON, et. al., 2000), o SCF (DE PAULIS, et. al., 1999); proteoglicanos de heparina [(METCALFE, 1979), e sulfatos de condroitina (METCALFE, 1979)]. Essas células são capazes de superar o grande obstáculo termodinâmico de armazenar altas concentrações desses mediadores na forma de grânulos, aprisionando-os em uma matriz de gel composta por sulfatos aniônicos de condroitina e heparina (UVNAS, 1992).

A biogênese dos grânulos dessas células envolve fusão regulada de várias unidades de pequenos grânulos (pequenas unidades de grânulos) (HAMMEL, et. al., 1985). Essas unidades iniciam a formação desses grânulos na região externa do complexo de Golgi (trans-Golgi), e a fusão de grânulos se dá na região exterior do Golgi formando pro-grânulos que irão ganhar volume no citoplasma da célula formando grânulos maduros. Os pro-grânulos são múltiplas unidades de grânulos (ou seja, o volume de pro-grânulo é três vezes maior que a unidade do grânulo, e a unidade do grânulo maduro é três vezes o que a do pro-grânulo).

Várias proteínas estão envolvidas na síntese e maturação dos grânulos dessas células, entre elas: Rab GTPase, onde a Rab3d e Rab5 estão envolvidas na fusão de grânulos imaturos no complexo de Golgi (AZOUZ, et. al., 2014). Os lisossomos também apresentam uma função importante no controle da fusão desses grânulos onde, quando a fusão dos grânulos não

ocorre da maneira correta, forma-se grânulos gigantes nos mastócitos, conhecidos como síndrome de *Chediak-Higashi* (DURCHFORT, et. al., 2012) considerada uma imunodeficiência.

Outras proteínas como as *Synaptotagmins*, que são um grupo formado por 15 proteínas de membrana, tem papel importante na maturação dos grânulos dos mastócitos. Um estudo com células *RBL* mostrou que quando administrado anti- *synaptotagmins* em animais, esses apresentavam grânulos largos, prejuízo na maturação dos grânulos, além de levar esses grânulos a vias de reciclagem biológica ao invés da maturação (GRIMBERG, et. al., 2003). Por outro lado, a família de proteínas *Granin*, primeiramente descrita em células neuroendócrinas, também são importantes na biogênese e maturação dos grânulos dos mastócitos. Uma proteína dessa família, a *secretogranin III*, por exemplo, está presente em grânulos de mastócitos, durante a desgranulação, os níveis dessa proteína se esgotam levando a ativação de genes para síntese de novos grânulos (PRASAD, et. al., 2008). Embora a função biológica desta família de proteínas não esteja ainda bem compreendida, elas estão envolvidas no sequestro de colesterol, interação com chaperonas de proteínas granulares, servem como precursores de grânulos e funcionam com proteínas tamponantes de cálcio. É possível que algumas das suas muitas funções sejam necessárias para controlar a fusão dos pró grânulos e, assim, ajudar a sua maturação dos lisossomos.

Alguns mediadores presentes nos grânulos como a histamina e proteoglicanos, como serglicina também são componentes importantes no processo de maturação dos grânulos. Por exemplo, camundongos *knockout* para serglicina têm grânulos de secreção funcional, mas eles apresentam defeito na formação do núcleo denso (HENNINGSSON, et. al., 2006). Em adição, células com essas características tornam-se resistentes a apoptose (MELO, et. al., 2011). Por outro lado, a falta de histamina ou de enzimas que controlam sua síntese altera a morfologia e conteúdo de grânulos. Camundongos *knockout* para histidina carboxilase mostraram grânulos morfologicamente anormais e contendo menos proteases e heparina (NAKAZAWA, et. al., 2014). Esta alteração ocorre principalmente devido à infra-regulação de genes que codificam os grânulos das proteases e enzimas envolvidas na biossíntese da heparina. Curiosamente, agonistas do receptor de

histamina H4 ou a aplicação exógena de histamina restauram a maturação desses grânulos. Portanto, a histamina provavelmente influencia os primeiros passos na maturação dos grânulos, mas tem um papel pequeno na manutenção da integridade dos grânulos formados totalmente maduros. Por fim, componentes da família de proteínas adaptadoras que são proteínas que podem ligar-se a cauda citosólica de proteína trans-membranares, facilitando a sua entrada em vesículas de brotamento, foram identificadas em células pancreáticas onde os pró grânulos são cobertos por clatrina para que ocorra a fusão e formação de grânulos maduros, porém isso só acontece na presença dessa família de proteínas (BONNEMAISON, et. al., 2013).

#### **1.4 - MASTÓCITOS E O PROCESSO INFLAMATÓRIO**

Semelhante a células dendríticas, os mastócitos estão entre as primeiras células do sistema imunológico a interagir com os antígenos, toxinas e agentes patogênicos. Em adição à sua distribuição, essas células expressam na sua superfície vários receptores que são capazes de detectar sinais potencialmente nocivos que permitem que as outras células do sistema imune respondam rapidamente e de forma adequada via a liberação de mediadores pré-armazenados e neo-sintetizados. Os mastócitos podem reconhecer patógenos por diferentes mecanismos, incluindo ligação direta de PAMPs ou DAMPs aos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), ligação de anticorpos aos receptores para porção Fc ou pela ligação de patógenos opsonizados com proteínas do complemento aos receptores dessas opsoninas (HOFMANN E ABRAHAM 2009). O padrão de expressão desses receptores varia consideravelmente entre os diferentes subtipos de mastócitos. TLRs (*toll-like receptors*, 1-7 e 9), receptores para complemento, entre outros, são responsáveis pela ativação da resposta inata em mastócitos (MARSHALL, 2004; METZ, et al 2008;. FUKUDA et al.2013; GRAHAM et al. 2013).

A ativação dessas células ocorre por diferentes tipos de agente, como por exemplo: bactérias (ABRAHAM, et. al., 2010), vírus (DAKHAMA, et. al., 2004), fungos (KULKA, et. al., 2004), parasitos (ARTIS, et. al., 2000), toxinas (BEGHDADI W., et. al., 2011) entre outros agentes, como o composto 48/80 que é conhecido por ser um potente agente indutor capaz de liberar

seletivamente a histamina dos mastócitos por um processo de desgranulação excitotica, primariamente de células mastocitárias, com a subsequente depleção de histamina tecidual (PATON, 1951; NIEMEGERES, et. al., 1978; BRONNER et al., 1987). Porém, a ativação via IgE ainda continua sendo a mais estudada (WENERSSON E PEJLER, 2014). A ativação dessa célula leva à liberação de mediadores inflamatórios, que contribuem para a propagação do sinal inflamatório e também aciona respostas imunes adaptativas quando necessário.

A desgranulação envolve múltiplos eventos de fusão de membrana, incluindo tanto de fusão grânulo-grânulo como a fusão dos grânulos com a membrana plasmática (TIWARI, 2008). Tais eventos são crucialmente dependentes da interação entre várias v-SNARE que estão presentes no grânulo das membranas e t-SNAREs que estão presentes sobre a membrana alvo (ou na membrana plasmática ou na membrana de outro grânulo) (SANDER, 2008).

Quando este evento ocorre, muitos mediadores com diversas funções, entre elas inflamatórias, são liberados para os tecidos, os quais estão mostrados na tabela abaixo.

<b>Características e Funções dos Grânulos dos Mastócitos</b>		
<b>Constituinte</b>	<b>Características Principais</b>	<b>Função</b>
<b>Proteases Específicas de Mastócitos</b>		
Triptase	Serino proteinase	Pró-Inflamatória
Quimase	Serino proteinase	Pró-Inflamatória
Carboxipeptidase	Metaloproteinase	Proteção contra toxinas
<b>Proteases Não-Específicas de Mastócitos</b>		
Catepsina G	Metaloproteinase	Antibacteriana
Granzima B	Serino proteinase	Anti-apoptótica
Metaloproteinase IX	Metaloproteinase	Formação da matrix

<b>Proteínas associadas a fusão de membrana</b>		
VAMP2, VAMP3, VAMP7 e VAMP8	v-SNAREs	Degranulação
Syntaxin 3	t-SNAREs	Degranulação
Synaptotagmin II e synaptotagmin III	Proteína adaptadora para fusão da membrana	Sensor de cálcio
MHC II	Apresentação de antígenos extracelulares	Ativação de células
<b>Aminas Bioativas</b>		
Histamina	Presente em TODOS os tipos de mastócitos	Vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular
Serotonina	Presente em altas concentrações em mastócitos de roedores	Neurotransmissor
Dopamina	Baixas concentrações	Neurotransmissor
<b>Citocinas e Fatores de Crescimento</b>		
TNF- $\alpha$	Primeira citocina liberada	Inflamatória
IL-4	Liberada pelo crosslink de IgE	Polarizar resposta TH2
VEGF	Liberada pelo crosslink de IgE	Angiogênese
IL-5	Presente no citoplasma	Aumento de eosinófilo
IL-6	Presente no citoplasma	Inflamatória
IL-15	Associada aos grânulos porém, não liberada	Supressão da atividade bactericida do mastócito
TGF- $\beta$	Liberada durante a degranulação	Atividade fibrotica
<b>Proteoglicanas</b>		
Serglicina	Alta expressão em mastócitos	Estocagem das aminas vasoativas

Enzimas lisossomais		
$\beta$ -hexosaminidase	Enzima presente na degranulação da célula	Regulação da função normal do lisossomo

Tabela 1 adaptada de Wernersson S. e Pejler G., 2014.

Em meados de 1990 foi demonstrado, em mastócitos de roedores, a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a LPS (lipopolissacarídeo) sem que houvesse a desgranulação (LEAL-BERUMEN, 1996). Desde então, uma grande variedade de produtos associados de organismos patogênicos incluindo CpG (oligodesoxinucleótidos), toxina colérica (LEAL-BERUMEN, 1996) e componentes da parede celular de leveduras, como o zimosan, têm mostrados induzir a expressão seletiva de citocinas sem induzir a desgranulação. Vários agentes patogênicos, incluindo o vírus da dengue (MARSHALL, et. al., 2003) e bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* (LIN, et. al., 2002, 2003) têm apresentados efeitos semelhantes e, essas observações levaram a uma reavaliação do potencial do mastócito como célula participante na defesa do hospedeiro a qual tem sido eficaz, particularmente contra organismos que não induzem completa desgranulação.

Recentemente, observou-se que as citocinas e quimiocinas liberadas pelos mastócitos induzidas em resposta aos agentes patogênicos, são altamente seletivas. Por exemplo, anticorpos específicos para vírus, como o da dengue, levam à produção de pequenas quantidades de IL-1 $\beta$  e IL-6 (KING, 2002). Esse perfil de secreção de citocinas pode contribuir para a ativação de células endoteliais e o recrutamento seletivo de células T. Em contraste, as células tratadas com *P. aeruginosa* produzem grandes quantidades de CCL20, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL8 e GM-CSF, mas não produzem quantidades significativas de CCL5 (LIN, et. al., 2003). Tal resposta é esperada para promover o recrutamento e aumento de sobrevivência de neutrófilos locais, bem como o recrutamento e indução da maturação de células dendríticas imaturas (DCs).

Estudos de produtos específicos de patógenos e seus receptores estão permitindo definir as vias pelas quais essas respostas seletivas ocorrem. Por exemplo, em estudos recentes com mastócito humano, em resposta mediada por TLR2, ativado por moléculas de *S. aureus* ou zimosan demonstrou-se que essa ativação induz quantidades substanciais de citocinas pró-inflamatórias e

leucotrienos com pouca ou nenhuma liberação de grânulos pré-formados, ou seja, com pouca desgranulação. Em contraste, um polipeptídeo, o tri-palmitoilado, que se liga a heterodímeros de TLR1-TLR2 induz desgranulação e a produção de considerável quantidade de IL-1 $\beta$  e GM-CSF, sem produção mensurável de leucotrienos (ZHU, 2001). Esta capacidade de mastócitos em responder seletiva e rapidamente à patógenos está relacionada com a resposta imune do hospedeiro e, compreender esses mecanismos moleculares poderá proporcionar importantes oportunidades para modificar respostas imunitárias com adjuvantes ou imunoterapias.

Os mastócitos ainda apresentam receptores para várias citocinas, desempenhando um papel intermediário entre a resposta imune inata e adaptativa (SHEA-DONOHUE, et. al., 2010). Mastócitos também se comunicam tanto com células T como células B. A produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  por mastócitos ativados por LPS, via TLR4, facilita o desenvolvimento do perfil de resposta imune Th1 (VOSSKUHL, et. al., 2010), apoiando um papel regulador de mastócitos na imunidade.

As células imunes, incluindo mastócitos, são controladas, em parte, por sinais positivos e negativos envolvendo antígeno ou moléculas produzidas pelo organismo. Perda de sinais inibitórios pode contribuir para o desenvolvimento da inflamação promovendo várias doenças autoimunes ou reações de hipersensibilidade imediata podendo culminar com reações de choque anafilático (RABENHORST A, et. al., 2012). Uma parcela de mastócitos apresenta receptores de inibição baseado em tirosina (resíduos ITIM) considerados como parte da superfamília de receptores inibitórios. Estudos recentes mostram que c-kit pode ser regulado negativamente por ligação de CD72 (Lyb-2), um receptor transmembranar da família das lectinas de tipo C (KATAOKA, 2010). Em adição, descobertas recentes mostraram o receptor inibitório da alergia (allergin-1) presente nos mastócitos humanos (HITOMI, et. al., 2010) demonstrando assim, mais uma vez, seu papel modulador na resposta imune.

## 1.5 - ALCALOIDES: IMPORTÂNCIA FARMACOLÓGICA

As plantas medicinais correspondem as mais antigas armas utilizadas pelo homem no tratamento de enfermidades (MARTINS, et. al., 1995). Estas são constituídas de moléculas químicas conhecidas como metabólitos secundários, responsáveis pelas atividades farmacológicas. Entre os metabólitos secundários conhecidos, existem os alcaloides, que são um grupo heterogêneo de substâncias nitrogenadas (SIMOES, et al., 2010)

Várias atividades farmacológicas já foram descritas para os alcaloides, entre elas, ansiolítica como a *annomontina*, e *liriodenina* (CHANG, et. al., 2004), anti-emética como a atropina (CARVALHO, et. al., 1999), analgésica como a morfina (Yesilyurt et al, 2015), anti-inflamatória como a warifteina e curina (LIMA, et. al., 2015; LEITE, et. al., 2014), entre outras.

No tocante a atividade anti-inflamatória, vários alcaloides se destacam, entre eles, a curina, oriunda da *Chondrodendron platyphyllum*, inibiu significativamente a formação de edema da pata, diminuindo a permeabilidade vascular e reduzindo a resposta de contorção abdominal induzida por ácido acético (LEITE, et. al., 2014). A caulerpina, presente em *Caulerpa racemosa*, reduziu a peritonite induzida por carragenina diminuindo significativamente o recrutamento de células para o peritônio (DE SOUZA, et. al., 2009). A pilocarpina, oriunda de *Pilocarpus microphyllus*, reduziu a ativação da microglia e a produção de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no hipocampo e no córtex adjacente, tendo assim atividade anti-inflamatória (WANG, et. al., 2015).

Um alcaloide utilizado na clínica, a morfina, oriunda de *Papaver somniferum*, reduziu a hiperalgesia. Em animais tratados com a morfina observou-se diminuição do número de macrófago sugerindo envolvimento da morfina na depleção de macrófagos e redução do quadro inflamatório. A morfina também induziu o aumento da expressão de gene endógeno opióide, proencefalina, e a diminuição da citocina pro-nociceptiva, interleucina-1 $\beta$ . Por outro lado, a ciclooxygenase (COX-2), produzida principalmente a partir de macrófagos periféricos em estados de inflamação aguda, foi regulada na fase inicial em locais com injeção de morfina (GODAI, 2014).

Outro alcaloide, a warifteína, oriunda de *Cissampelos sympodialis* Eichl, a mesma planta a qual a milonina é obtida, inibiu a migração de neutrófilos induzida por caseína para a cavidade peritoneal, mas não inibiu a mobilização de neutrófilos na medula óssea. Além de diminuir a aderência de neutrófilos e a migração *in vitro* o alcaloide apresentou o efeito de diminuir a adesão celular com o envolvimento das moléculas de adesão P e E-selectina presentes nas plaquetas e endotélio (LIMA, et. al., 2015).

### **1.6 - CISSAMPELOS SYMPODIALIS EICHL. (MENISPERMACEAE)**

A planta *Cissampelos sympodialis* Eichl. (*Menispermaceae*) é endêmica no Nordeste brasileiro (BARBOSA-FILHO, AGRA e THOMAS, 1997) apresentando os nomes populares de milona, abuteira ou orelha de onça. As suas raízes são utilizadas, em forma de maceração, pela medicina popular para o tratamento de diarreias, doenças do trato geniturinário e doenças do trato respiratório tais como: asma, influenza e bronquite (CORREIA, 1984).

Ensaio farmacológico demonstraram que o extrato hidroalcoólico das raízes de *Cissampelos sympodialis* (AFR- *alcoholic fraction from roots*) apresentou ação espasmolítica na musculatura lisa de traqueia de cobaias sensibilizados com ovalbumina (OVA) (THOMAS et al., 1995).

Posteriormente, foi demonstrado que o AFL (*alcoholic fraction from the leave*) inibiu a resposta proliferativa de células esplênicas de camundongos BALB/c (PIUVEZAM et al., 1999; ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003a), a proliferação de linfócito B e a produção de IgM, quando essas células foram estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou com anticorpo anti-IgM (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003b), demonstrando que o extrato das folhas da planta interfere na atividade imunológica e que apresenta potencial contra doenças relacionadas, estimulando a continuidade da pesquisa.

Em paralelo aos estudos na área de imunofarmacologia foram realizados estudos na área de fitoquímicos que descreveram o isolamento, identificação e caracterização dos compostos dos extratos de *Cissampelos sympodialis*. Dentre eles estão os alcaloides bisbenzilisquinolínicos - warifteína e metilwarifteína, o alcaloide morfinânico - milonina e o alcaloide aporfínico- laurifolina (BARBOSA-FILHO, AGRA e THOMAS, 1997). O alcaloide roraimina, do tipo

bisbenzilisoquinolínico, foi isolado posteriormente (DE LIRA et al., 2002), demonstrando que a maior parte de metabólitos secundários presentes nos extratos de *C. sympodialis* são representados por alcaloides.

A warifteina (W) apresenta peso molecular de 592 u, possuindo em sua molécula uma ponte metilênica, que é uma característica pouco comum às substâncias desta classe (BARBOSA-FILHO, AGRA e THOMAS, 1997). A warifteina foi o alcaloide isolado e encontrado em maior proporção nos extratos hidroalcoólicos das raízes e das folhas da planta *Cissampelos sympodialis* (BARBOSA-FILHO, AGRA e THOMAS, 1997; MARINHO et al., 2012) o que justifica a sua escolha como um marcador molecular, pré-requisito para a produção de um fitoterápico a partir de um extrato padronizado (MARINHO, 2012; RESOLUÇÃO-RDC Nº- 48, DE 14 DE MARÇO DE 2004).

A warifteina demonstrou ter ampla atividade farmacológica, dentre elas: bloqueadora neuromuscular (GORINSKY et al. 1972); relaxante de músculos lisos de íleos de cobaias (CÔRTEZ et al.,1995) e ação espasmolítica em músculo liso de aorta de coelho por modificação do metabolismo do cálcio ( $Ca^{++}$ ) (FREITAS et al., 1996). A warifteina também foi capaz de aumentar os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) em cultura de músculo liso de cobaia pela inibição da atividade enzimática da fosfodiesterase IV e V (THOMAS et al., 1997b).

Ensaio de toxicidade aguda da warifteina em camundongos demonstraram que a dose letal para 50% (DL50) dos animais é de 511 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.). Entretanto, por via oral (v.o.), doses até 1000 mg/kg não induziram mortalidade nos animais durante o tempo de avaliação (CÔRTEZ, 1992). As avaliações de citotoxicidade de warifteina e milonina em culturas de hepatócitos e fibroblastos mostraram que a concentração inibitória de 50% das células (CI50) varia de 10 a 35  $\mu$ M de acordo com a metodologia empregada (MELO et al. 2003).

Estudos em modelo de alergia experimental demonstraram que o tratamento com warifteina (v.o.) reduziu a eosinofilia provocada pelo antígeno na pleura e no lavado bronco-alveolar (BAL) de animais sensibilizados com OVA, assim como reduziu os níveis pleurais de cistenil-leucotrienos e a inflamação alérgica pulmonar (BEZERRA-SANTOS et al., 2006).

Em estudo posterior, foi observado que o tratamento com warifteina, inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia induzida por IgE, na presença de antígeno ou por mediadores fisiológicos, inibiu a produção de IgE total e de IgE antígeno-específica e ainda reduziu a formação de edema de pata pelo mecanismo dependente da produção de IgE, assim como inibiu a desgranulação de mastócitos e a proliferação de esplenócitos *in vitro* (COSTA et al., 2008). No entanto, a warifteina induziu a produção de óxido nítrico (NO) de macrófagos peritoneais (COSTA et al., 2008) demonstrando induzir um perfil de resposta imunológica inibitória ao desenvolvimento da resposta imune alérgica.

A warifteina exibiu efeitos similaridades aos demonstrados com a fração de alcaloides da folha (AFL); Rocha e colaboradores (2010) demonstram que a warifteina age diretamente na função dos linfócitos B inibindo a proliferação e secreção de Ig, modificando o padrão de fosforilação de tirosina cinase ativada por mitógeno ERK e os níveis intranucleares de NFκB. Associado à inibição da atividade dos sinalizadores intracelulares, a warifteina promove o aumento de AMPc em linfócitos B e em homogenato de músculo liso (THOMAS et al., 1997b).

Warifteína ainda inibe a expressão de moléculas de adesão como a P e E selectina em neutrófilos em modelo experimental de inflamação peritoneal por caseína, diminuindo assim o processo inflamatório agudo (LIMA, et. al., 2015).

A metil-warifteina, um derivado metilado natural da warifteina induziu aumento nos níveis de AMPc em homogenato de músculo liso com potência superior à warifteina (THOMAS et al., 1997b), contudo a menor quantidade deste alcaloide nos extratos limitou as pesquisas. Em adição a metil-warifteina reduziu o número de linfócitos T no BAL (lavado bronco alveolar) sugerindo que a planta com seus compostos regula essa população de células (VIEIRA et al. 2013).

Por fim, a warifteina e sua molécula metilada (metil-warifteina) também modulam a resposta imune em camundongos BALB/c com alergia alimentar. (Costa, 2013), demonstrando assim seus diversos efeitos em diferentes modelos biológicos experimentais.

A milonina, alcaloide objeto desse estudo, tem sido pouco estudada entretanto, no modelo experimental que avalia o sistema cardiovascular onde

ratos normotensos que receberam injeções de milonina apresentaram hipotensão e taquicardia, que foram atenuados após administração de N (w) - nitro-L-arginina metil ester (L-NAME; 20 mg / kg, iv). Em anéis de mesentérica tratados com fenilefrina, a milonina promoveu relaxamento dependente do endotélio vascular (CAVALCANTE, et. al., 2011).

O efeito relaxante induzido por milonina foi atenuado na presença de KCl, um modulador de efluxo de K (+), ou bloqueadores do canal de potássio tais como glibenclamida, ou caribdotoxina mais apamina. Além disso, a pré-contracção com saturação extracelular de potássio foi reduzido quando tratado com milonina, induzindo esta relaxamento vascular (CAVALCANTE, et. al., 2011).

Em conclusão, os efeitos hipotensor e vasorelaxante da milonina são, em parte, mediados pelo endotélio, provavelmente via a libertação de óxido nítrico (NO), a ativação da via do NO-GMPc e abertura de K (+) canais (Cavalcante, et. al., 2011). Os efeitos citotóxicos de milonina foram avaliados em culturas de hepatócitos e de fibroblastos V79 via o teor de ácido nucleico, a redução de tetrazólio (MTT) e captação de vermelho neutro (NRU). A milonina apresentou-se com menor potencial tóxico quando comparada com a warifteína em ambas as culturas de células, isto é, os valores de IC50 nos três diferentes ensaios de viabilidade, foram cerca de 100 e 400 microm para a milonina e para a warifteína variou de 10 a 35 microM (MELO, et. al., 2003).

Os efeitos citotóxicos semelhantes detectados em fibroblastos V79 e hepatócitos da warifteína e da milonina podem estar relacionados ao citocromo P450. Esta hipótese foi corroborada pelos resultados onde cimetidina (1,0 mM), um inibidor do citocromo P450, não protegeu as células da ação tóxica do warifteína ou milonina. Em conclusão, estes alcaloides merecem investigações adicionais pois apresentam potenciais efeitos farmacológicos principalmente quanto a atividade anti-inflamatória (Melo, et. al., 2003).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar o alcaloide milonina de cissampelos sympodialis EICHL (menispermacear) em modelos experimentais de inflamação aguda mediada por mastócito tendo em vista a ampla atividade farmacológica dos outros alcaloides constituintes da planta em modelos experimentais de hipersensibilidade imediata.

# ***OBJETIVOS***

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Avaliar o efeito da milonina, alcaloide de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (*Menispermaceae*), na resposta inflamatória aguda, mediada por mastócitos.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

1. Avaliar a atividade anti-edematogênica de milonina no modelo de edema de pata induzido por agentes flogísticos como: carragenina, composto 48/80 ou histamina;
2. Analisar o tecido das patas e pele dos animais submetidos ao tratamento com milonina e cromoglicato dissódico por técnicas histológicas;
3. Investigar a ação da milonina no choque anafilático induzido pelo composto 48/80;
4. Avaliar o atividade antipruriginosa (*scratching behavior*) da milonina no modelo de coceira induzido pelo composto 48/80;
5. Analisar a ação da milonina em testes nociceptivos como o teste das contorções abdominais e da placa quente.

# ***METODOLOGIA***

---

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. LOCAL DA PESQUISA**

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunofarmacologia/UFPB em colaboração com o laboratório de Psicofarmacologia/UFPB para a realização das técnicas de dor inflamatória e central.

#### **3.2. OBTENÇÃO DA MILONINA**

A milonina foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho. As soluções desse alcaloide foram preparadas dissolvendo-se 1 mg do material na forma de pó em 50  $\mu$ L de HCl 1N e em seguida adicionando-se 800  $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,9%). O pH foi ajustado para 7 com uma solução de hidróxido de sódio 1M e o volume completado para 1000  $\mu$ L.

#### **3.3. ANIMAIS**

Camundongos Swiss fêmeas com peso corporal entre 25 e 30g foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de  $25 \pm 2$  °C e submetidos a um ciclo de claro e escuro de 12 horas (6:00 as 18:00 claro e de 18:00 as 6:00 escuro) com livre acesso à água e a uma dieta controlada a base de ração do tipo *pellets* (PURINA) durante todo o período de experimentação. Os camundongos foram fornecidos pelo biotério Professor Thomas George do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPFarm) da UFPB. A manipulação dos animais foi realizada de acordo com o guia de cuidado animal (SHERWIN et al., 2003). Os animais foram eutanaziados por overdose de anestésicos (Xilazina 20 a 30 mg/kg + Quetamina 200 a 300 mg/kg). Para cada condição experimental foram utilizados cerca de 4 animais, seguido de repetições dos experimentos a fim de formar um “n” total de 8 animais para cada grupo experimental. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em uso animal da instituição sob número 125/2015 (Anexo)

### 3.4. TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Os camundongos foram pré-tratados oralmente (v.o.) com milonina (0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg) e desafiados, 1h após os tratamentos, com agentes flogísticos. As doses utilizadas do alcaloide foram previamente determinadas tomando como parâmetro a da warifteína que também é um alcaloide oriundo de *Cissampelos sympodialis* (Costa, et. al., 2008).

Como droga padrão para os experimentos inflamatórios de edema de pata por carragenina, foi utilizada a indometacina (10mg/Kg), via oral. Para os experimentos de edema de pata induzido por composto 48/80, choque anafilático e *scratching behaviour*, utilizou-se o cromoglicato dissódico (10mg/Kg), via oral. Para os experimentos de edema de pata induzido por histamina, prometazina (10mg/Kg), via intra-muscular (i.m). Por fim, nos experimentos de nocicepção foi utilizada a morfina (5mg/Kg), via intra-peritoneal (i.p.). Em todas as condições experimentais os animais foram pré-tratados e após desafiados com os agentes flogísticos.

### 3.5. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR AGENTES FLOGÍSTICOS: CARRAGENINA, COMPOSTO 48/80 OU POR HISTAMINA

Esta situação experimental fundamenta-se no fato de que a administração de agentes flogísticos locais, como a pata de um animal, produzirá uma reação inflamatória local caracterizada pela formação de edema, reprodutível e facilmente mensurável, o qual constitui-se como um sinal cardinal inflamatório. Os agentes inflamatórios ou flogísticos são compostos que induzem um processo inflamatório no tecido com os quatro sinais cardinais inflamatórios devidamente observados. Antes da realização dos experimentos, a espessura das patas traseiras dos camundongos foram medidas com um paquímetro digital (GREAT, MT – 04513) e a diferença entre a pata direita e esquerda foram consideradas como a medida basal. O edema de pata foi induzido como previamente descrito por Henriques e colaboradores, (1987). Uma hora após os tratamentos, camundongos Swiss foram desafiados, ou seja, receberam uma injeção *intraplantar* (ipl) de uma solução contendo

carragenina (500 µg/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA) ou composto 48/80 (100ng/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA), dissolvidos em 20µl de solução de PBS na pata posterior esquerda. A pata direita recebeu o mesmo volume de PBS e foi utilizada como controle. O diâmetro de cada pata foi medido usando um paquímetro digital em 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas para o edema avaliado quando a carragenina foi o agente flogístico e após 30 e 60 minutos, quando o agente flogístico avaliado foi o composto 48/80.

Em outra série de experimentos, camundongos Swiss receberam uma injeção *ipl* de uma solução contendo histamina (100µg/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA), dissolvidos em 20µL de uma solução de PBS na pata esquerda e o mesmo volume de PBS na pata direita, a indução do edema foi avaliada em 30 e 60 minutos após o estímulo com histamina. Em ambos os experimentos, os edemas foram calculados pela diferença obtida entre o diâmetro da pata esquerda e direita nos tempos indicados usando o paquímetro digital (NAIDU et al., 2010).

### **3.6. COLETA DE TECIDO E MORFOMETRIA**

As patas dos animais tratados com milonina ou cromoglicato dissódico e desafiados com o composto 48/80, foram coletadas e limpas com salina gelada, fixadas imediatamente em solução de formol 10% durante 24 horas e posteriormente parafinizadas. Outro tipo de tecido coletado foi a pele dos animais submetidos aos mesmos tratamentos, porém em diferente modelo experimental, o do *scrating behavior* (prurido), no qual os tecidos passaram pelos mesmo tratamentos para posterior inclusão.

Secções de 5 µm foram geradas por microtomia, fixadas em lâminas para microscopia e coradas para a quantificação de parâmetros inflamatórios como, vasodilatação, estase, necrose, presença de polimorfonucleares além da formação de edema, alterações estas evidenciadas pelo corante Hematoxilina&Eosina as quais foram avaliadas via microscópio óptico comum, isso para ambas as análises, de pata e da pele. Ainda para as análises de pele, estas foram submetidas a um corante diferencial, o azul de toluidina, corante este que cora por metacromasia os mastócitos teciduais. As imagens foram

obtidas em aumento total de 40X (56.000  $\mu\text{m}^2/\text{campo}$ ) por uma microcâmara moticom 5 (5MP) e analisados com o software Motic Imagens Plus 2.0.

Após análise morfológica, foi criado um *score* (pontuação), com a finalidade de gerar significância as avaliações visuais, aonde este vai de 0 – 4, quantificado de acordo com a lesão evidenciada. Quando a lesão em evidência for o edema inflamatório, zero (0) significa ausência de edema, (1) edema com dimensão de 25% da área estudada, (2) edema com dimensão de 50% da área estudada, (3) edema de 75% da área estudada e (4), edema de 100% da área estudada, ou seja, total separação epiderme-derme. Para avaliação da migração de células tanto por hematoxilina e eosina, quanto por azul de toluidina, (zero) significa ausência de células inflamatórias, (1) até 10 células inflamatórias, (2) de 11 a 20 células inflamatórias, (3) de 21 a 30 células inflamatórias e (4) de 31 a 50 células inflamatórias. Avaliado em 5 campos da lâmina (Costa, 2013; ZOU, 2014).

### **3.7. REAÇÃO DE CHOQUE ANAFILÁTICO INDUZIDA PELO COMPOSTO 48/80**

Para a indução do modelo experimental de choque anafilático, camundongos foram divididos em 5 grupos ( $n=4$ ). Para a indução experimental da doença, os camundongos receberam por via intraperitoneal a administração do composto 48/80 (10mg/kg em PBS). Os animais foram observados por 1 hora após a administração do composto e a mortalidade ou sobrevivência foi avaliada nos tempos de 10, 30 e 60 minutos.

### **3.8. INDUÇÃO E AVALIAÇÃO DO *SCRATCHING BEHAVIOR* (PRURIDO)**

Este protocolo foi utilizado para avaliar o potencial antipruriginoso da milonina. Para isso, camundongos Swiss foram tratados por via subcutânea (s.c.). Uma hora depois, estes animais receberam uma injeção intradérmica do composto 48/80 (10 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$  de PBS) na parte rostral das costas. Imediatamente após a injeção, o comportamento dos animais foi observado por um período de 60 minutos, via filmagem dos grupos experimentais. O número de *scratching* (coceira) foi padronizado como a quantidade de vezes que o

animal coça o local da injeção com a pata posterior (INAGAKI et. al, 2002).

### **3.9. TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO**

Este teste fundamenta-se da administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético a 1 % a qual provoca irritação peritoneal, envolvendo estimulação dos nociceptores, gerando reações comportamentais, sendo tal efeito nociceptivo caracterizado por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores. Este modelo nos permite avaliar a nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER et al., 1959). Para este experimento, utilizou-se cinco grupos de camundongos (n=4), onde os grupos receberam por via oral o pré-tratamento com a milonina (0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg), salina por via oral ou morfina (5 mg/kg) por via intra-peritoneal. Após 1 hora os animais foram desafiados com uma solução de ácido acético 1% (0,1 mL/10 g) e colocados em caixas de polietileno individuais, sendo então observada a latência, ou seja, o tempo para o aparecimento da primeira contorção após a administração do ácido acético nos cinco primeiros minutos do experimento. Em seguida, registrou-se o número total de contorções abdominais apresentado por cada animal durante 20 minutos de observação. Redução estatisticamente significativa do número de contorções quando comparado ao grupo ácido acético foi considerada uma resposta antinociceptiva (BASTOS et al., 2006).

### **3.10. TESTE DA PLACA QUENTE**

O teste da placa quente consiste em quantificar o tempo em que o animal permanece sobre uma placa metálica, pré-aquecida a  $56\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Os parâmetros avaliados como nociceptivos são o tempo de lambida, levantamento ou mordida da pata, o qual é cronometrado e considerado como indicativo de resposta nociceptiva integrado no centro supra espinal da medula (YAMAMOTO, et. al., 2002).

Inicialmente os animais foram submetidos a uma pré seleção na qual, não houve administração de qualquer substância, sendo considerado apto o animal que permanecer sobre a placa por um tempo máximo de 10 segundos.

Para este experimento, utilizou-se cinco grupos de 4 camundongos, onde os grupos receberam por via oral o tratamento com a milonina (0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg) e salina ou morfina (5 mg/kg) via intra-peritoneal. Em seguida, as observações aconteciam nos tempo de 30, 60 e 120 minutos após os tratamentos. O tempo máximo de permanência na placa foi de 30 segundos, para que não ocorresse ou minimizasse danos teciduais (PARK, et. al., 2011).

### **3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.). Todos os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e analisados estatisticamente empregando-se o ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* ou *Bonferroni*, onde os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

# ***RESULTADOS***

---

## **4.0. RESULTADOS**

### **4.1. EFEITO DA MILONINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.**

O gráfico 1 mostra os resultados obtidos nos grupos dos animais tratados oralmente com milonina (2,0 ou 10mg/Kg), tendo a indometacina (10mg/Kg) como droga padrão, também administrada por via oral para esta condição experimental. Os animais foram pré-tratados 1h antes da administração do agente flogístico, carragenina (500µg/pata), na pata esquerda dos animais e pode-se observar que nos animais tratados com milonina (2,0 ou 10mg/Kg) ou indometacina (10mg/kg) houve diminuição do tamanho da pata do animal quando comparado ao grupo carragenina. Na primeira hora após o desafio com a carragenina, apenas a dose de 2,0mg/kg.foi capazes de reduzir o edema formado,  $p<0,05$ .

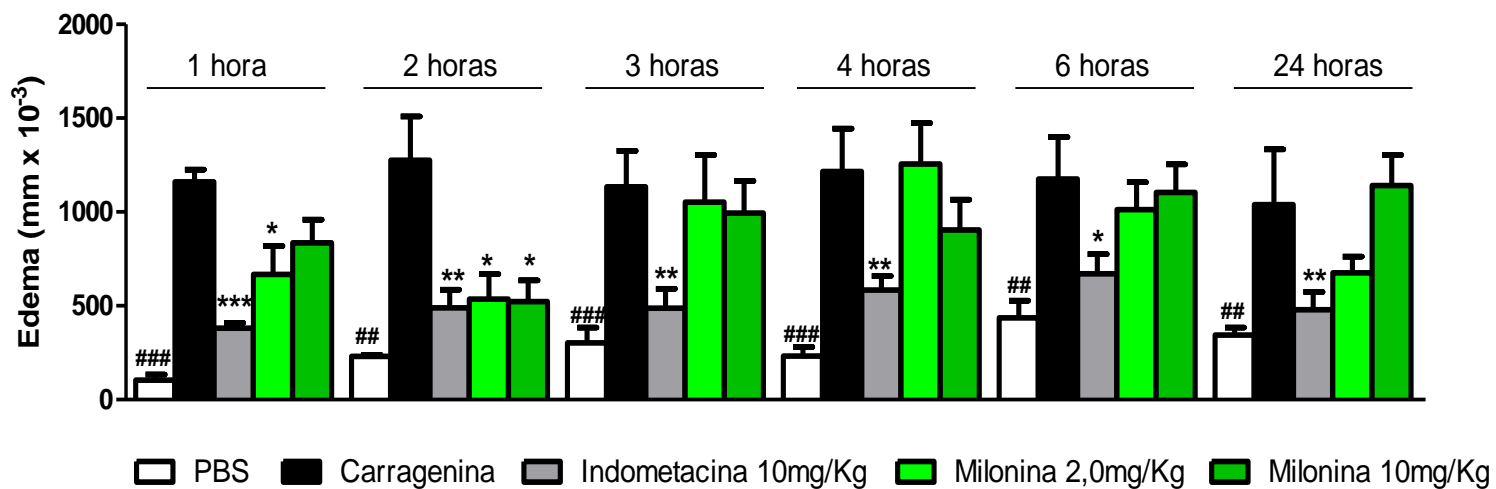
No tempo de 2h, as duas doses testadas da milonina (2,0 ou 10mg/Kg) reduziram o edema formado pela carragenina ( $p<0,05$ ). Porém, nos demais tempos não houve redução significativa do edema formado nos animais tratados por milonina.

A droga padrão indometacina (10mg/Kg) reduziu de forma significativa, ( $p<0,05$ ,  $p< 0,01$  ou  $p<0,001$ ) o edema formado pela carragenina a depender do tempo analisado.

E, nos animais que não foram desafiados por carragenina, não foi observado edema, mostrando assim a funcionalidade do modelo experimental.

A partir desses dados, elegemos outras doses de milonina a partir da dose de 2,0mg/kg como doses a serem estudadas, tendo em vista a dose de 2,0mg/kg ter sido a única a funcionar no edema em 1h e no edema de 2h, ela funcionar da mesma maneira que a dose de 10mg/Kg. Diante disso, as doses utilizadas foram 0,5mg/kg, 1,0mg/kg ou 2,0mg/kg de milonina.

**Gráfico 1. Efeito do tratamento oral com a milonina sobre o edema de pata induzido por carragenina**

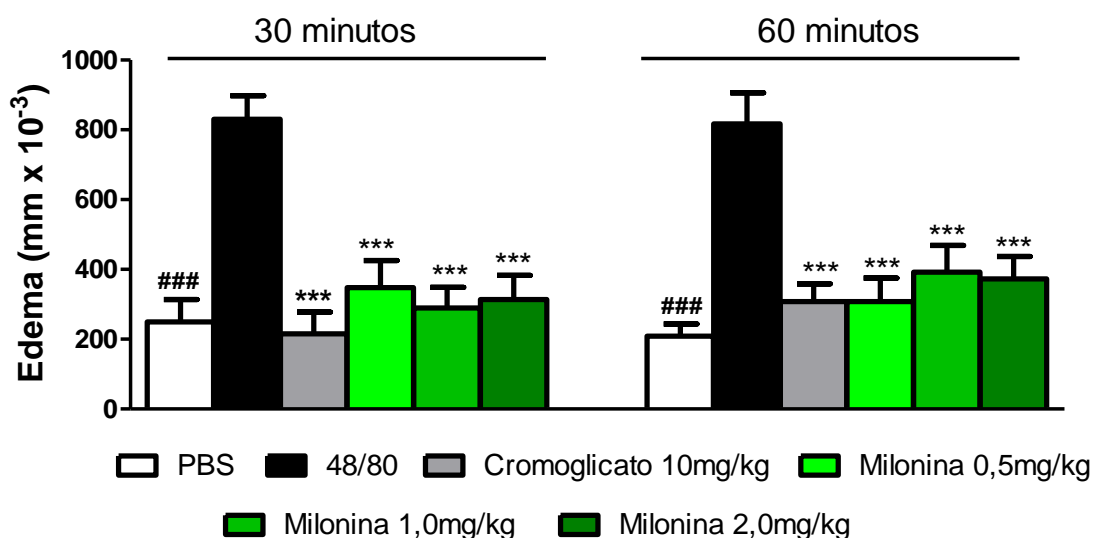


**Gráfico 1:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com a milonina nas doses indicadas, indometacina, ou PBS e após 1 h, receberam a injeção intraplantar de carragenina (500 µg/pata) na pata esquerda e PBS na pata direita. O grupo PBS recebeu injeção de PBS em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a administração da carragenina. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=8). \* p < 0,05 , \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001 quando comparados ao grupo carragenina. ANOVA "one-way" seguido do teste de *Bonferroni*.

#### 4.2. EFEITO DA MILONINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80.

O gráfico 2 mostra o efeito do tratamento oral dos animais com a milonina (0,5, 1,0 ou 2,0mg/Kg) ou cromoglicato dissódico (10mg/Kg) 1 h antes do desafio com o agente flogístico composto 48/80 (100ng/pata). Os tratamentos foram capazes de diminuir significativamente ( $p < 0,001$ ) a formação do edema de pata induzido por composto 48/80 em todos os tempos estudados.

**Gráfico 2. Efeito do tratamento oral com a milonina sobre o edema de pata induzido por composto 48/80**

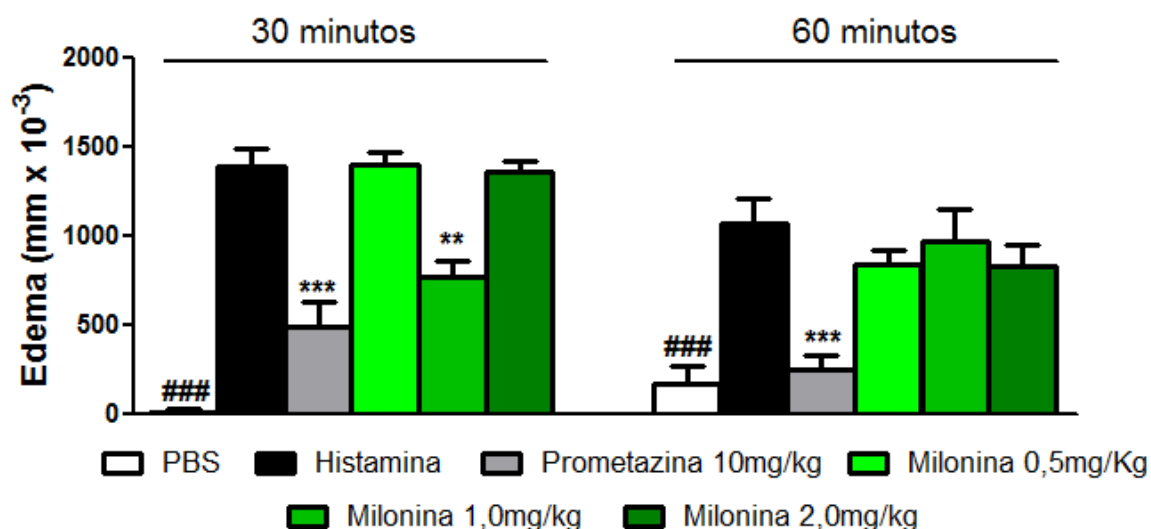


**Gráfico 2:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com a milonina nas doses indicadas, cromoglicato dissódico, ou PBS e após 1 h, receberam a injeção intraplantar do composto 48/80 (100ng/pata) na pata esquerda e PBS na pata direita. O grupo PBS recebeu injeção de PBS em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda nos tempos de 30 e 60 minutos após a administração do composto 48/80. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=8$ ) \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados ao grupo 48/80. ANOVA "one-way" seguido do teste de *Bonferroni*.

### 4.3. EFEITO DA MILONINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR HISTAMINA.

O gráfico 3 mostra o efeito do tratamento oral dos animais com a milonina (0,5, 1,0 ou 2,0mg/Kg) ou prometazina (10mg/Kg) via intra-muscular, 1h antes do desafio com o agente flogístico histamina (100µg/pata). A dose de milonina de 1,0mg/Kg foi capaz de diminuir significativamente ( $p < 0,01$ ) o edema formado pela histamina no tempo de 30 minutos. As demais doses de milonina não diminuíram significativamente o edema formado pela histamina nos tempos estudados. A prometazina (10mg/Kg) via intra-muscular inibiu de forma significativa ( $p < 0,001$ ) o edema formado pela histamina em todos os tempo estudados.

**Gráfico 3. Efeito do tratamento oral com a milonina sobre o edema de pata induzido por histamina**

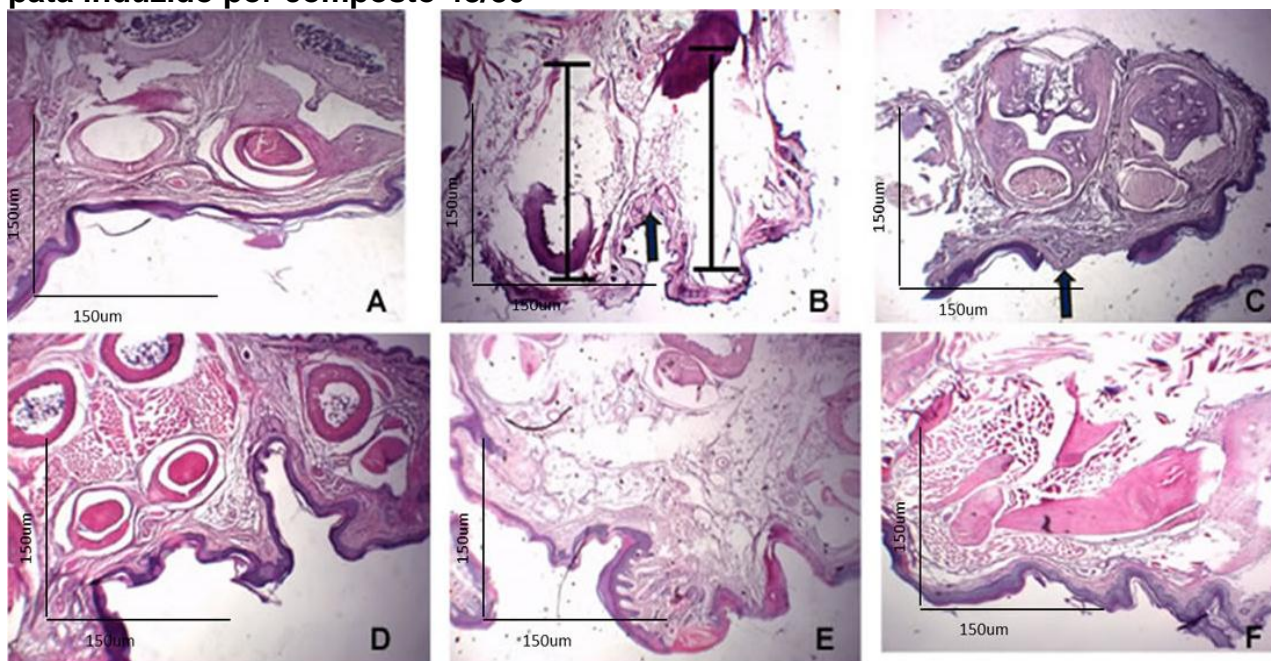


**Gráfico 3:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com a milonina nas doses indicadas, prometazina, ou PBS e após 1 h, receberam a injeção intraplantar de histamina (100µg/pata) na pata esquerda e PBS na pata direita. O grupo PBS recebeu injeção de PBS em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda nos tempos de 30 e 60 minutos após a administração da histamina. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=8$ ) \*\* $p < 0,1$ , \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados ao grupo histamina. ANOVA "one-way" seguido do teste de Bonferroni.

#### **4.4. ANÁLISE HISTOPATOLOGICA DA MILONINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80.**

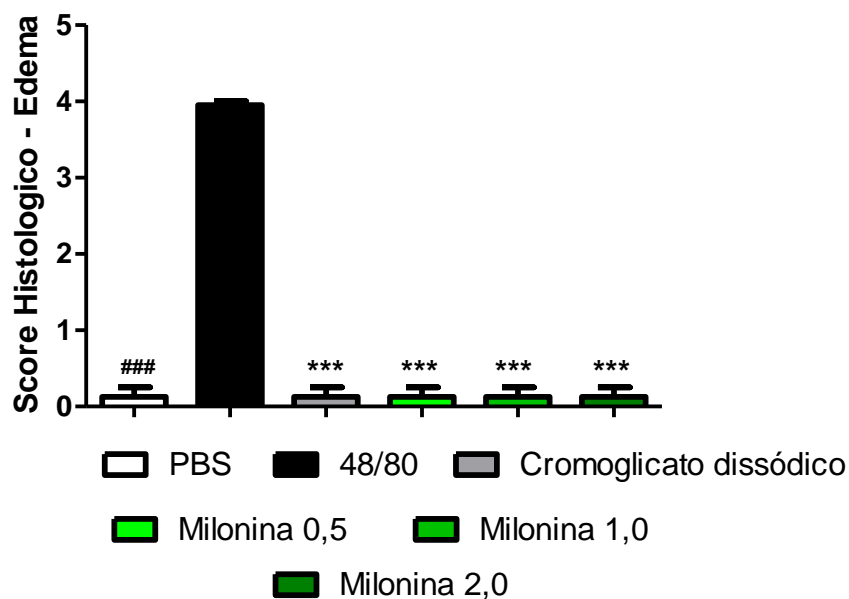
A figura 1 (A –F) mostra o efeito morfológico do tratamento oral dos animais com a milonina (0,5, 1,0 ou 2,0mg/Kg) ou cromoglitado dissódico (10mg/Kg) 1 h antes do desafio com o agente flogístico composto 48/80 (100ng/pata) em modelo experimental de edema de pata. Nas imagens coradas pela hematoxilina e eosina, vistas em um aumento total de 40X observa-se que nos animais do grupo PBS (A) houve a manutenção do arcabouço do tecido, como a manutenção de padrões vasculares, celulares e teciduais. Nos animais do grupo 48/80 (B), houve grande formação de edema (mostrado na imagem), seguido do desgaste da epiderme e derme (mostrado por seta), observa-se também grande desgaste do tecido em todo o espaço percorrido na lâmina. Nos animais do grupo cromoglicato dissódico (10mg/Kg) (C), não houve formação de edema de pata, nem demais parâmetros inflamatórios. A milonina nas doses testadas 0,5mg/Kg (D), 1,0mg/Kg (E) e 2,0mg/kg (F) não apresentou formação de edema de pata apresentando manutenção de tecidos e órgãos como arteríolas, epiderme e derme.

**Figura 1. Análise histopatológica da milonina sobre o edema de pata induzido por composto 48/80**



**Figura 1:** Análise histopatológica da pata dos animais. Camundongos Swiss foram pré-tratados com a milonina nas doses testadas, cromoglicato dissódico, ou PBS e após 1 h, receberam a injeção intraplantar do composto 48/80 (100ng/pata) na pata esquerda e PBS na pata direita. O animal PBS, está indicado como animal A, o animal 48/80 está indicado como B, o animal cromoglicato dissódico como animal C, o animal milonina 0,5mg/Kg como animal D, o animal milonina 1,0mg/Kg como animal E e o animal milonina 2,0mg/Kg como animal F. O grupo PBS recebeu injeção de PBS em ambas as patas. O edema é avaliado pela perda de continuidade tecidual apresentada pela separação epiderme-derme. Observa-se também desgaste das camadas da epiderme, mostrado pela seta. Tecidos corados por hematoxilina e eosina, vistos em microscópio óptico comum em aumento total de 40X.

**Gráfico 4. Análise histopatológica da milonina sobre o edema de pata induzido por composto 48/80**



Camundongos Swiss foram pré-tratados com a milonina 0,5mg/kg, milonina 1,0mg/kg, milonina 2,0mg/kg, cromoglicato dissódico, ou PBS e após 1 h, receberam a injeção intraplantar do composto 48/80 (100ng/pata) na pata esquerda e PBS na pata direita. Score inflamatório no qual foi quantificado edema inflamatório. Tecidos corados por hematoxilina e eosina, vistos em microscópio óptico comum em aumento total de 40X. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (n=8) \*\*\* p < 0,001 quando comparados ao grupo 48/80. ANOVA “one-way” seguido do teste de *Tukey*.

#### **4.5. EFEITO DA MILONINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CHOQUE ANAFILÁTICO INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80.**

A tabela 2 mostra o efeito do tratamento oral dos animais com a milonina (0,5, 1,0 ou 2,0mg/Kg) ou cromoglitado dissódico (10mg/Kg) 1h antes do desafio com o agente flogístico composto 48/80 (10mg/kg em PBS) intra peritonealmente, em modelo experimental de choque anafilático. Os tratamentos foram capazes de levar os animais a sobrevivência após passarem pela reação do choque anafilático em todas as doses testadas, sendo a dose de 2,0mg/kg capaz de proteger um maior número de animais da condição experimental a eles apresentada. Os animais do grupo cromoglicato dissódico (10mg/Kg) tiveram proteção em apenas 10 minutos após a indução experimental da doença, porém todos morreram em 30 minutos. Os animais do grupo 48/80 morreram todos nos primeiros 30 minutos da condição experimental a eles submetida.

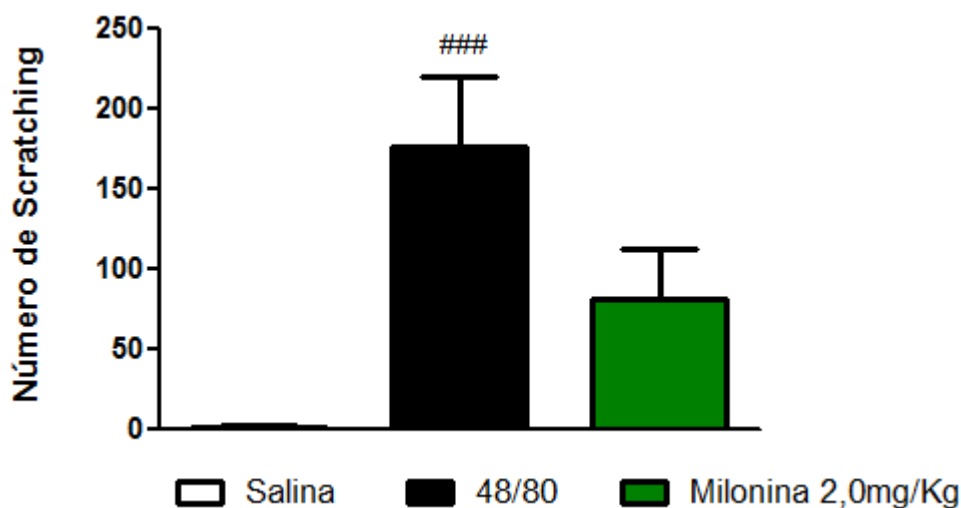
**Tabela 2. Efeito do tratamento oral com a milonina sobre a reação de choque anafilático induzida por composto 48/80**

<b>CHOQUE ANAFILÁTICO</b>					
<b>Grupos</b>	<b>Tempo (minutos)</b>				<b>Sobrevivência</b>
	0´	10´	30´	60´	
<b>PBS</b>	8/8	---	---	---	<b>8/8 (100%)</b>
<b>48/80</b>	8/8	2/8	8/8	---	<b>ZERO</b>
<b>Cromoglicato Dissódico (10mg/kg)</b>	8/8	---	8/8	---	<b>ZERO</b>
<b>Milonina 0,5mg/kg</b>	8/8	1/8	6/8	---	<b>1 (12,5%)</b>
<b>Milonina 1,0mg/kg</b>	8/8	1/8	6/8	---	<b>1 (12,5%)</b>
<b>Milonina 2,0mg/kg</b>	8/8	---	2/8	----	<b>6 (75%)</b>

#### 4.6. EFEITO DA MILONINA EM MODELO EXPERIMENTAL *SCRATCHING BEHAVIOUR* (PRURIDO) INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80.

O gráfico 5 mostra o efeito do tratamento oral dos animais com a milonina (2,0mg/Kg) 1 h antes do desafio com o agente flogístico composto 48/80(10µg/20uL de salina) na parte rostral das costas de forma intra dérmica, em modelo experimental de *scratching behaviour*.. O tratamento não foi capaz de diminuir de forma significativa o número de *scratching*.

**Gráfico 5. Efeito do tratamento oral com a milonina em modelo experimental de *scratching behaviour*.**

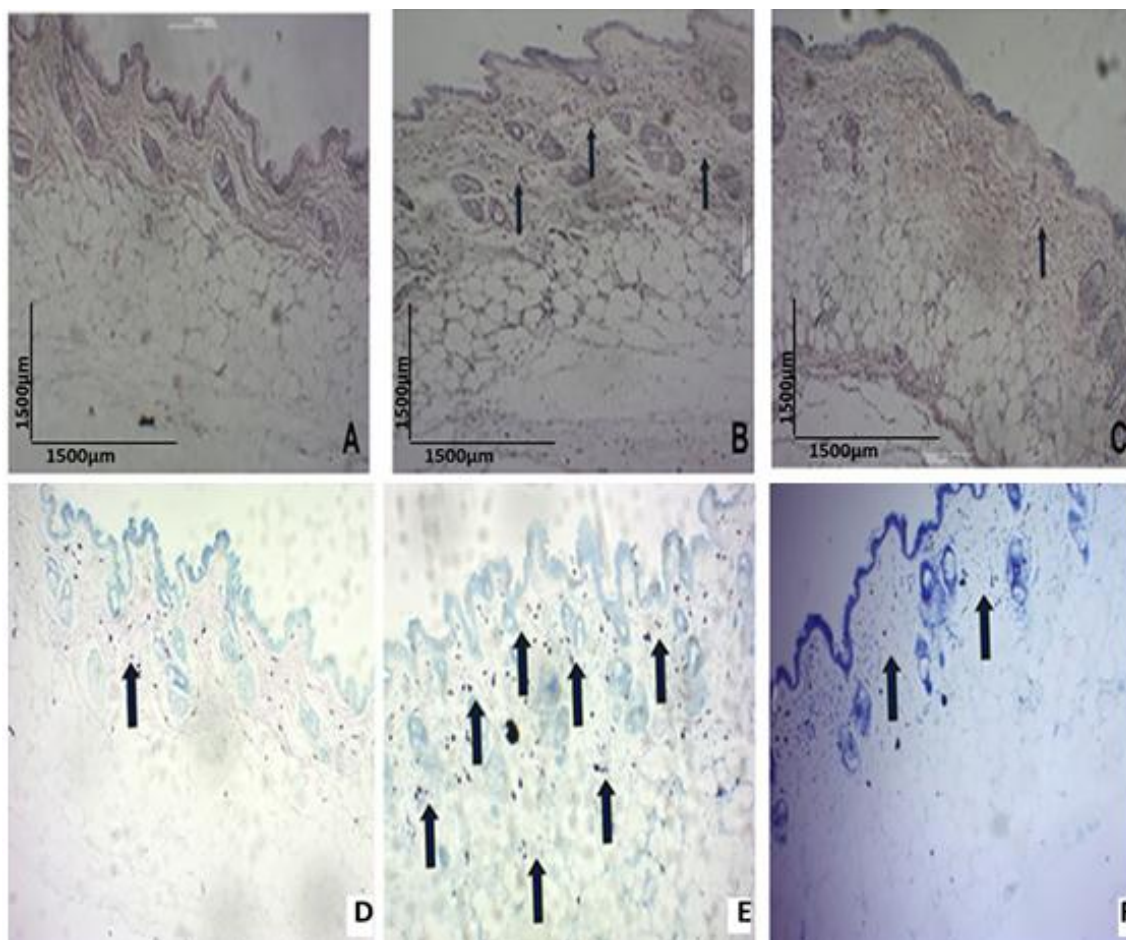


**Gráfico 6:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com a milonina na dose indicada, ou PBS. Após 1 h, receberam a injeção intra dérmica do composto 48/80 (2,0mg/Kg) na parte rostral das costas. O grupo PBS recebeu injeção de PBS. O efeito antipruriginoso avaliado foi padronizado como a quantidade de vezes que o animal coça o local da injeção com a pata posterior durante o tempo de 60 minutos após a administração do composto 48/80. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=8) \*\*\* p < 0,001 quando comparados ao grupo 48/80. ANOVA “one-way” seguido do teste de *Tukey*.

#### **4.7. ANÁLISE HISTOPATOLOGICA DA MILONINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE *SCRATING BEHAVIOUR* (PRURIDO) INDUZIDO POR COMPOSTO 48/80.**

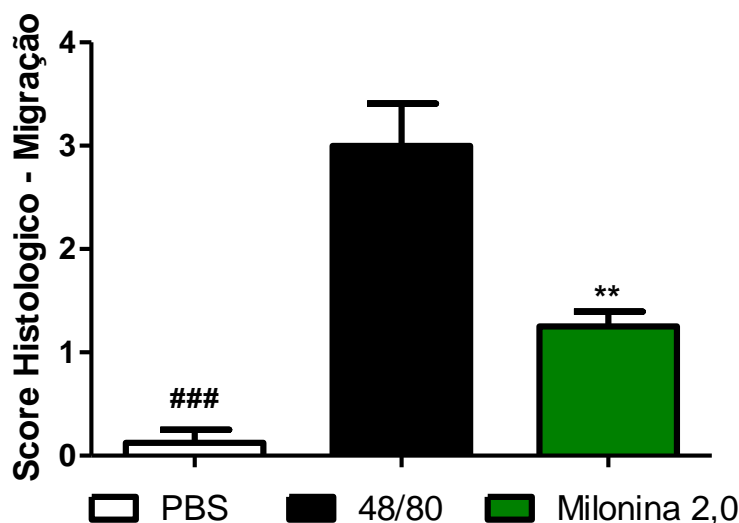
A figura 2 mostra o efeito morfológico do tratamento oral dos animais com a milonina (2,0mg/Kg) 1h antes do desafio com o agente flogístico composto 48/80 (10µg/20uL de salina) em corte histológico de pele. Nas imagens coradas pela hematoxilina e eosina (A-C), vistas em um aumento total de 40X observa-se que os animais do grupo PBS (A), apresentaram plena manutenção do arcabouço tecidual, os animais do grupo 48/80 (B), apresenta manutenção do arcabouço tecidual seguido de aumento do número de células inflamatórias na derme e os animais do grupo milonina (C) na dose testada (2,0mg/kg) apresentam características semelhantes aos animais do grupo 48/80, porém, possuem um número menor de células inflamatórias na dérmicas. A figura 2 (D –F) mostra o efeito morfológico do tratamento oral dos animais com a milonina (2,0mg/Kg) 1 h antes do desafio com o agente flogístico composto 48/80 (10µg/20uL de salina) em corte histológico de pele, dessa vez usando como corante o azul de toluidina. As imagens vistas em um aumento total de 40X evidenciam que os animais do grupo PBS (D), apresentaram plena manutenção do arcabouço tecidual, no entanto, os animais do grupo 48/80 (E), apresentam alto número de mastócitos na derme evidenciadas pela coloração roxa dada pelo corante, a qual evidencia mastócitos e os animais do grupo milonina (F) na dose testada (2,0mg/kg) apresenta diminuição de mastócitos teciduais quando comparado ao grupo 48/80 assemelhando-se ao grupo PBS.

**Figura 2. Análise histopatológica da pele de animais pré tratados com milonina ou PBS submetidos ao modelo experimental de *scratching behaviour***

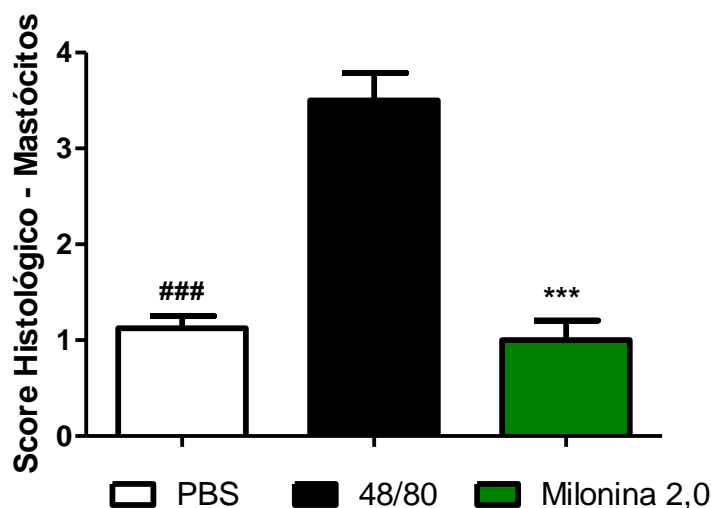


**Figura 2:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com a milonina 2,0mg/kg (C/F), ou PBS e após 1 h, receberam a injeção intradérmica do composto 48/80 (10µg/20uL de salina) na parte rostral das costas. O animal 48/80 está indicado como B/E. O grupo PBS recebeu injeção de PBS (A/D). O parâmetro observado nesta análise é a migração de células inflamatórias para derme. De A-C, tecidos corados por hematoxilina e eosina; De D-F, tecidos corados por azul de toluidina, vistos em microscópio óptico comum em aumento total de 40X.

**Gráfico 6. Análise histopatológica da pele de animais pré tratados com milonina ou PBS submetidos ao modelo experimental de *scratching behaviour*. Gráfico A e B.**



**Gráfico A:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com milonina 2,0mg/kg ou PBS e após 1 h, receberam a injeção intradérmica do composto 48/80 (10µg/20uL de salina) na parte rostral das costas. Score inflamatório no qual foi quantificado o número de células inflamatórias. Tecidos vistos em microscópio óptico comum em aumento total de 40X. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=8) \*\* p < 0,01 quando comparados ao grupo 48/80. ANOVA “one-way” seguido do teste de Tukey.

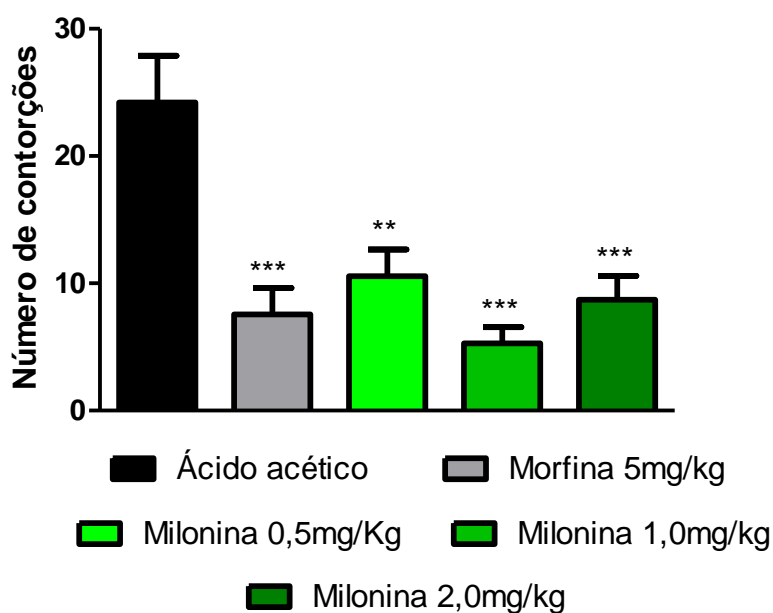


**Gráfico B:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com milonina 2,0mg/kg ou PBS e após 1 h, receberam a injeção intradérmica do composto 48/80 (10µg/20uL de salina) na parte rostral das costas. Score inflamatório no qual foi quantificado o número de células inflamatórias, especificamente mastócitos. Tecidos vistos em microscópio óptico comum em aumento total de 40X. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=8) \*\*\* p < 0,001 quando comparados ao grupo 48/80. ANOVA “one-way” seguido do teste de Tukey.

#### 4.8. EFEITO DA MILONINA NO TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO.

O gráfico 7 mostra o efeito do tratamento oral dos animais com a milonina (0,5, 1,0 ou 2,0mg/Kg) ou morfina (5mg/Kg) via intra-peritoneal, 1h antes do desafio com o agente flogístico ácido acético 1% (0,1 mL/10 g). Todas as doses de milonina foram capazes de diminuir significativamente ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ) o número de contorções abdominais no tempo de 20 minutos. A morfina (5mg/Kg) via intra-peritoneal, droga padrão utilizada, também inibiu de forma significativa ( $p < 0,001$ ) o número de contorções abdominais geradas pelo ácido acético nos tempos estudados.

**Gráfico 7. Efeito do tratamento oral com a milonina em modelo experimental de contorção abdominal induzida por ácido acético**

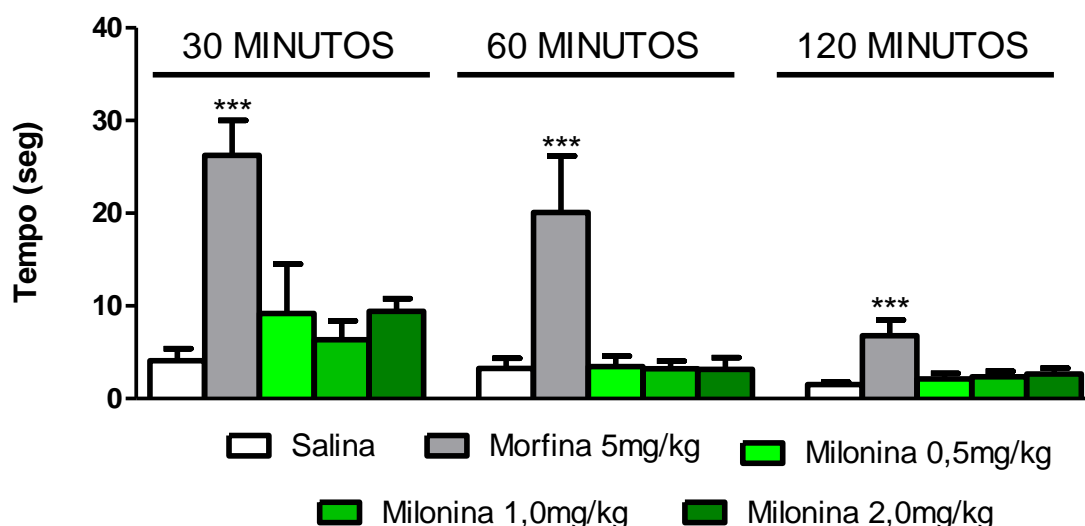


**Gráfico 7:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com a milonina nas doses indicadas, morfina, ou PBS e após 1 h, receberam a injeção intra-peritoneal de ácido acético 1% (0,1/10g). O efeito nociceptivo foi avaliado pelo número de contorções abdominais no tempo de 20 minutos após a administração do ácido acético. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=8$ ) \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados ao grupo ácido acético. ANOVA “one-way” seguido do teste de *Tukey*.

#### 4.9. EFEITO DA MILONINA NO TESTE DA PLACA QUENTE.

O gráfico 8 mostra o efeito do tratamento oral dos animais com a milonina (0,5, 1,0 ou 2,0mg/Kg) ou morfina (5mg/Kg) via intra-peritoneal, nos tempos de 30, 60 e 120 minutos dos animais submetidos ao teste da placa quente. Nenhuma das doses testadas de milonina foram capazes de aumentar significativamente o tempo de permanência dos animais sobre a placa quente nos tempos estudados. A morfina (5mg/Kg) via intra-peritoneal, aumentou de forma significativa ( $p < 0,001$ ) o tempo de permanência dos animais sobre a placa quente em todos os tempos estudados.

**Gráfico 8. Efeito do tratamento oral da milonina no teste da placa quente**



**Gráfico 8:** Camundongos Swiss foram pré-tratados com a milonina nas doses indicadas, morfina, ou PBS e foram submetidos ao teste da placa quente. O efeito foi avaliado pelo tempo de permanência dos animais sobre a placa nos tempos indicados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (n=8) \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados ao grupo morfina. ANOVA "one-way" seguido do teste de *Tukey*.

# ***DISCUSSÃO***

---

## 5.0 DISCUSSÃO

Durante séculos as sociedades utilizam de seus conhecimentos empíricos a fim de melhorar sua alimentação e tratar de suas enfermidades, criando uma inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução tanto culinária quanto terapêutica (MIGUEL & MIGUEL, 2000). Provavelmente a utilização das plantas como medicamento seja tão antiga quanto o próprio homem. Numerosas etapas marcaram a evolução da arte de curar, contudo torna-se difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina esteve por muito tempo associada a práticas mágicas, místicas e ritualísticas principalmente durante a idade média (MARTINS, et. al., 1995).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera fundamental que se realize levantamentos periódicos de cada região fitogeográfica do Brasil e do mundo acerca do uso, manejo e aplicação farmacológica de plantas medicinais, além do conhecimento fitoquímico das espécies e presença de marcadores químicos que caracterizem as mesmas a fim de garantir a eficácia e segurança no uso dessas espécies vegetais, principalmente, quanto este ocorre no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (SANTOS MRA; LIMA MR; FERREIRA MGR. 2008).

A família Menispermaceae é constituída, em sua maioria, de trepadeira as quais encontra-se preferencialmente nos trópicos. Embora o número de espécies desta família não seja expressivo em comparação com o de outras famílias de plantas, as mesmas apresentam grande importância por apresentarem componentes biologicamente ativos, como alcaloides, e serem usadas na medicina tradicional em vários países. Além disso, diversas espécies da família Menispermaceae têm sido cientificamente identificadas por suas atividades farmacológicas, incluindo a atividade anti-inflamatória aguda e crônica (JAHAN et al., 2010; VIEIRA et al. 2013).

A família ainda, no ponto de vista fitoquímico, é muito rica em compostos bensilisoquinolínicos (alcaloides), lignanas tipo furofurano, flavonas e flavonóis, proantocianidinas. Entre algumas espécies o que mais chama atenção tem sido a grande diversidade de alcalóides derivados de bensiltetrahydroisoquinolina e aporfina acumulada como dímeros, como por exemplo, alcaloides

morfinâmicos, como a milonina e diversos outros tipos de alcaloides, tais como derivados de azafluoranteno (KESSLER, P.J.A., 1993).

Estudos recentes com a planta *Cissampelos sympodialis* EIHCL (Menispermaceae) demonstram que alguns constituintes isolados da planta, como a warifteína (seu marcador fitoquímico) e a metil-warifteína, possuem atividade antialérgica em modelo experimental de alergia alimentar murino com possível efeito anti-inflamatório, além de inibir a resposta alérgica asmática em modelo experimental murino (COSTA, 2013; VIERA, 2013).

Baseados nas informações acima, sendo a milonina um dos componentes da planta, investigamos o possível efeito anti-inflamatório do alcaloide morfinâmico, milonina, presente em *Cissampelos sympodialis* EIHCL (Menispermaceae) em modelos experimentais de inflamação aguda, tais como indução de edema de pata por diferentes agentes flogísticos, como a carragenina, composto 48/80 e histamina, análise histopatológica com corantes gerais e especiais de tecidos como pata e pele, indução da reação de choque anafilático, *Scracting behaviour* além de modelos experimentais de dor, como a placa quente e contorções abdominais.

O processo inflamatório é uma resposta fisiológico e benéfico do hospedeiro contra agentes externos, como microrganismos, além de rupturas teciduais, como lacerações, o qual tem por finalidade a volta da homeostase o que culminará, quando necessário com o processo de reparo tecidual. Porém quando esta resposta se dá de forma exacerbada ou prolongada, esta perde seu efeito benéfico, tornando-se maléfico e sendo responsável pela patogênese de várias doenças, como a asma, artrite reumatoide, aterosclerose além de doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico, entre outras (SRIVO, et. al., 2011).

A administração subcutânea de agentes flogísticos como a carragenina, o composto 48/80 e a histamina na região subplantar das patas traseiras de camundongos provoca uma reação inflamatória aguda localizada levando ao inchaço das patas (edema) pelo imediato extravasamento de líquido e proteínas para o tecido inflamado. Estes modelos experimentais têm sido considerados eficazes na identificação de novos compostos com ação anti-inflamatória (KANAAAN et al., 1997; POSADAS et al., 2004; NAIDU et al., 2010).

O presente trabalho demonstrou que a milonina, um alcaloide isolado de *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae), quando administrada por via oral, reduziu o edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina, composto 48/80 e histamina. Os processos inflamatórios induzidos por esses agentes apresentam características semelhantes tais como extravasamento proteico, vasodilatação e acúmulo de leucócitos, porém os mediadores envolvidos são diferentes em algumas etapas do processo inflamatório (FANTUZZI et al., 1997; POSADAS et al., 2004; NAIDU et al., 2010).

A carragenina é um agente flogístico que causa uma reação inflamatória reprodutível e facilmente mensurável, fatos que têm contribuído para mantê-la como uma das principais ferramentas farmacológicas para experimentos que envolvem a análise de processos inflamatórios agudos (LAZZARINI et al., 2003). Neste modelo a carragenina promove um aumento imediato da permeabilidade vascular, induzida por mediadores inflamatórios tais como prostaglandinas (PGs), bradicinina, histamina, moléculas do sistema complemento, e óxido nítrico (NO) (0-6h). A permeabilidade vascular seguida do recrutamento de neutrófilos (6-24 h) para o local da inflamação, sendo este modelo útil para análise de edema de pata em dois momentos, onde no primeiro temos a liberação de mediadores que causam vasodilatação, que causa edema, seguido do aumento da permeabilidade microvascular e no segundo momento um edema formado pela migração de células do processo inflamatório (POSADAS et al., 2004).

Diferentes doses da milonina (2,0 e 10 mg/kg) foram testadas no modelo de edema de pata induzido por carragenina e, as doses de 2,0 e 10 mg/kg reduziram o edema de pata de forma semelhantes sugerindo efeito anti-inflamatório deste alcaloide. Estes dados se assemelham como os dos estudos realizados por Costa (2008) onde a dose de 2,0 mg/kg e 10mg/kg de warifteína foram eficazes na diminuição do edema de pata formado por ovalbumina. Outros alcaloides também como a curina na dose de 2,5mg/kg diminuem o edema de pata formado pela carragenina (LEITE, 2013).

Vários estudos com alcaloides têm demonstrado que estas moléculas possuem importantes ações anti-inflamatórias (HIKINO et al., 1980; SEOW et al., 1988; TEH et al., 1990; WONG et al., 1992; DE SOUZA, et. al., 2009; CHUNG et al., 2011; WANG et al., 2011; DA SILVA et al., 2012; LEITE, et. al.,

2014;LIMA, et. al., 2015). A exemplo da atividade anti-inflamatória de alcaloides, temos o alcaloide berberina (alcaloide isoquinolínico) obtidos de raízes de *Berberis vulgaris* e isopirutalina e isotalictrina (alcaloides bisbenzilisoquinolínicos) os quais inibiram a formação do edema de pata em modelos de inflamação aguda induzidos por carragenina e zimosan além da atividade do sistema complemento. Outros alcaloides berbamina, palmatina e columbamina (alcaloides bisbenzilisoquinolínicos) também apresentaram efeitos semelhantes na formação do edema de pata induzida pela serotonina em aplicações orais e tópicas (KUPELI et al., 2002).

O Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba vem periodicamente estudando a planta *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae) e seu alcaloide warifteína (alcaloide bisbenzilisoquinolínico) em diferentes modelos de inflamação aguda e crônica e tem demonstrado que a warifteína inibiu o recrutamento de eosinófilos, a produção de eotaxina e cistenil leucotrienos na cavidade pleural, e no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovalalbumina (BEZERRA-SANTOS et al., 2006), além da diminuição de citocinas imunoregulatórias como IL-12 e interferon- $\gamma$  (COSTA, et. al., 2013) e inflamação pulmonar, além da diminuição de células CD3<sup>+</sup> e eosinófilos por esses alcaloides, inclusive a milionina (CARVALHO, et. al., 2013). Esses dados demonstram claramente o papel imunomodulador dos alcaloides de *Cissampelos sympodialis* nos processos inflamatórios mediados por alérgenos.

O Composto 48/80 é um polímero produzido por condensação de N-metil-p-metoxifenetilamina com formaldeído, sendo encontrados em uma mistura de dímeros e trímeros (PALOMAKI & LAITINEN, 2006; PATON, 1951). É um potente agente indutor capaz de liberar seletivamente a histamina dos mastócitos (PATON, 1951; NIEMEGEREERS, et. al., 1978; BRONNER et al., 1987). Outros estudos mostram que ocorre geração endógena de ácido lisofosfatídico, o qual também está envolvido com a liberação de histamina a partir dos mastócitos (HASHIMOTO, et al., 2005). O composto 48/80 promove a liberação de histamina por promover a desgranulação dos mastócitos teciduais, sendo amplamente utilizado há décadas em modelos experimentais, nos quais são avaliadas as funções dos mastócitos ou quantificação de histamina (HASHIMOTO, et al., 2005; RIBEIRO-FILHO, 2014). Não se sabe

exatamente de que maneira o composto 48/80 consegue levar à desgranulação do mastócito, porém sabe-se que ele leva a uma desgranulação de maneira não-lítica, ou seja, sem levar o mastócito à morte, com ativação de proteína G e liberação de diversos mediadores via mobilização de cálcio intracelular (GOMES et al., 1994; TATEMOTO, et. al., 2006;).

Diferentes doses da milonina (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg) foram testadas no modelo de edema de pata induzido por composto 48/80 e todas reduziram o edema de pata de formas semelhantes, sugerindo mais uma vez que o efeito anti-inflamatório deste alcaloide depende da ativação de mastócitos. Estes dados apresentam semelhanças com os dos estudos realizados por Ribeiro-Filho (2014), onde o alcaloide curina na dose de 2,5mg/kg administrados por via oral foi capaz de diminuir o edema de pata induzido por composto 48/80, além de diminuir a liberação de cistenil- leucotrienos, PGs e  $\beta$ -hemoxidase ( $\beta$ -hex).

Outros alcaloides como a aegelina ou N- [2-hidroxi-2- (4-metoxifenil) etil] -3-fenil-2-propenamida que é o principal alcalóide isolado a partir *Aegle marmelos correa*, planta nativa de Yogyakarta, Indonésia, inibiu a liberação de histamina a partir de células RBL-2H3 induzidas por DNP. Além disso, quando as células foram pré-tratadas com o alcaloide e incubadas com cálcio, a aegelina diminuiu a mobilidade do cálcio intracelular (NUGHORO, 2011).

Estudos demonstram que, quando o composto 48/80 ativa os mastócitos, essa ação ocorre diretamente na membrana dos mastócitos, os quais, ligando-se a receptores associados à proteína G, irão ativar a via da fosfolipase D, com consequente aumento da atividade da proteína quinase C (PKC), culminando no influxo de cálcio intracelular, o que leva à ativação dos mastócitos (WANG et al., 1994, PALOMAKI & LAITINEN, 2006). As mudanças iniciais promovidas pelo composto 48/80 ocorrem na superfície da célula e são compostas por duas fases, uma se caracteriza pelo rápido aumento do cálcio intracelular, e outra caracterizada por uma liberação contínua do cálcio intracelular (GILLESPIE et al., 1968).

Diante desses dados, sugere-se que a milonina esteja inibindo a desgranulação dos mastócitos por inibir o influxo intracelular de cálcio pelas vias supracitadas, podendo interagir diretamente na membrana por inibição da PLA2 ou de forma intracelular, inibindo a PKC ou algum receptor de estocagem

de cálcio, como os presentes no retículo endoplasmático. Experimentos adicionais serão realizados para comprovar tal hipótese.

A histamina é uma amina biogênica essencial presente em procariontes e tecidos de animais e plantas. Nos seres humanos, a histamina atua como um neurotransmissor, onde está envolvida em reações alérgicas, na proliferação celular, e é importante na sinalização de liberação de ácido gástrico no estômago. Os receptores de histamina são os alvos de drogas que tratam alergias e a hiperacidez do estômago, mas há pouca informação estrutural sobre os grupos farmacofóricos da histamina no tocante aos locais de ligação dessa molécula (NIRAJ, 2012).

Os efeitos da histamina são mediados por seus receptores acoplados a proteína G (GPCRs) H1, H2, H3, H4 (HARVEY et al., 1980; THURMOND et al., 2004; VARGA et al., 2005).

*In vitro*, os receptores H1 melhoraram a quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos humanos, mas os receptores H2 são inibidores de neutrófilos e eosinófilos (MERETEY, et al., 1989).

Milonina, nas doses de 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg, foi testada no modelo de edema de pata induzido por histamina e não se observou redução do edema de pata induzido pela histamina indicando que a ação desse alcaloide esteja relacionada, não à inibição da histamina no tecido, mas à inibição da liberação da histamina pelos mastócitos teciduais.

Outros alcaloides são capazes de diminuir o edema de pata por composto histamina a exemplo de curina e, em adição a aegeline, licarissina e biscoclaurina, *in vitro*, inibem a liberação de histamina ou degranulação de mastócitos por composto 48/80 (GHOSAL, et al., 1986;; NUGHORO, 2011; RIBEIRO-FILHO, 2014).

Os efeitos edematogênicos ocasionados pelos mediadores, tais como carragenina, histamina, PGE2 ou bradicinina, ocorrem por vias de sinalizações intracelulares. Por exemplo, os receptores de histamina e PGE2 presentes nas membranas citoplasmáticas de diversos tecidos são do tipo GPCR ligados à proteína Gαq/11 e Gαs, respectivamente, os quais ativam a enzima fosfolipase C e adenililciclase (JONES, et al., 2011; KALINSKI., 2012). Portanto, o mecanismo de ação da milonina pode não estar relacionado a esse bloqueio da ação da histamina já presente no tecido via proteína Gα, e sim atuar

diretamente no mastócito em um de seus receptores, impedindo o evento da desgranulação.

Para a análise microscópica de tecidos de diferentes órgãos sadios ou inflamados a utilização de técnicas de coloração histológica é de grande valia. As marcas morfológicas das reações inflamatórias agudas são a dilatação de pequenos vasos sanguíneos, lentidão do fluxo sanguíneo, acúmulo de leucócitos e hemácias no tecido e presença de fluidos no tecido extra vascular bem como observação das células teciduais. Porém outras observações patológicas também podem ser presenciadas, como a presença de morte celular e processos degenerativos (ROBBINS & COTTRAN, 2013).

Quando tratados por milonina, os animais apresentaram manutenção do arcabouço tecidual, sem desgaste epidérmico, o que pode ser gerado pela pressão que o edema causa ao epitélio, levando a rompimentos ou descontinuidade da queratina na camada córnea da epiderme. Ausência de edema inflamatório, que foi o principal sinal inflamatório avaliado, estava ausente nos animais do grupo tratados com milonina. Esta característica inflamatória é caracterizada pela perda da continuidade epiderme-derme.

Esses resultados se somam aos de outros alcaloides presentes na planta *Cissampelos sympodialis* os quais em modelos experimentais de hipersensibilidade imediata, também geram redução de parâmetros morfológicos inflamatórios como migração de células para o pulmão e aumento da expressão de células caliciformes, em modelo experimental murino de asma (VIEIRA, 2013), além de diminuição, por warifteína e metil warifteína, de células inflamatórias como eosinófilos e mastócitos em modelo experimental de alergia alimentar (COSTA, 2013).

Dentre as diversas reações fisiopatológicas mediadas por mastócitos, as reações de anafilaxia ou choque anafilático caracterizam por sinais e sintomas tais como eritema difuso, prurido, urticária e /ou angio edema, broncoespasmo, edema de laringe, hiper peristalse, hipotensão e / ou cardi-arritmias, náuseas, vômito, tontura, dor de cabeça, sensação de morte iminente, e inconsciência (KEMP et al., 2001, 2002). Portanto é uma reação aguda com risco de morte do indivíduo, mediada por mecanismos imunológicos, os quais resultam na liberação sistêmica e súbita de mediadores, tais como histamina, presentes em mastócitos e basófilos.

As reações de anafilaxia ou choques anafiláticos são reações alérgicas graves de início súbito e potencialmente fatal (SAMPSON, et al. 2006). O choque anafilático corresponde a manifestação mais grave da anafilaxia (LONGROIS, et al. 2011).

As reações patológicas com envolvimento do sistema imune foram descritas por Coombs e Gell (COOMBS RRA, GELL PGH, 1975), os quais classificaram essas reações em quatro tipos: hipersensibilidade tipo I ou imediata, mediada por IgE e tendo como células efetoras mastócito, o basófilo e o eosinófilo, hipersensibilidade tipo II ou citotóxica mediada por IgG ou IgM, hipersensibilidade tipo III ou complexos imunes, mediada pelas IgG e IgM e hipersensibilidade tipo IV ou tardia mediada por linfócitos T citotóxicos (COHEN SG, et. al 2002). Acreditava-se que somente reações Ig-E dependente poderiam causar reações de anafilaxia, entretanto, observou-se que não somente reações IgE-dependentes poderiam causar anafilaxia, mas também reações IgG ou IgM dependentes tais como transfusão de sangue incompatíveis as quais são classificadas como citotóxicos além de reações por imune complexos poderiam desenvolver reação semelhante. Diante disso, o termo definiu-se como reação anafilactoide como sendo uma reação de hipersensibilidade independente de IgE. (TALLO, FS et. al., 2012)

Em 1996 (SELL, et al. 1996) surgiu um outro sistema de classificação o qual propõe um classificação com base em 7 mecanismos imunopatológicos: 1 – reação de Inativação Imunomediada; 2 - Reação de ativação de moléculas biologicamente ativas; 3 –Reação citolítica mediada por anticorpos; 4 –reações imunológicas complexas; 5 – reações alérgicas; 6 – reações citotóxicas mediadas por linfócitos e 7 – reações granulomatosas. Sendo as reações anafiláticas incluídas na sua classificação como sendo as complexas reações imunológicas.

A ativação dos receptores H1 e H2 da histamina é que serão os responsáveis pelos sinais e sintomas da reação, como prurido, rinorréia, taquicardia, broncoespasmo os quais são causados em maior parte por ativação dos receptores H1. A ativação de ambos receptores H1e H2 mediaram sintomas como dor de cabeça, rubor e hipotensão (KALINER et. al., 1981). O nível sérico de histamina correlaciona-se com a gravidade e

persistência de manifestações cardiopulmonares, mas não com a formação da urticária ou prurido (SMITH et. al., 1980).

Vários são os agentes capazes de levar as reações anafiláticas, entre eles destacam-se: alimentos (amendoim, ovos, crustáceos), medicamentos (penicilinas), venenos como o composto 48/80, corantes, exercícios físicos, entre outras causas, entre elas idiopáticas (KEMP et al., 2002).

Laboratorialmente, vários modelos animais são utilizados para avaliação da degranulação de mastócitos induzindo reação de choque anafilático, entre eles os que utilizam o DNP ou composto 48/80 como agente causador da degranulação dessa célula, o qual leva a célula passar por uma desgranulação não citolítica com liberação de todos os mediadores presentes em seus grânulos (GHOSAL et al., 1986, COSTA, 2008, CHATTERJEA et al. 2012 RIBEIRO-FILHO, 2014.)

Diferentes doses da milonina (0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg) foram testadas no modelo experimental de choque anafilático induzida pelo composto 48/80, os quais observou-se que, em todas as doses testadas, proteção dos animais da morte por essa reação, sendo a dose de 2,0mg/kg capaz de proteger 75% dos animais frente ao estímulo, confirmando mais uma vez a potencial ação da substância em inibir a desgranulação do mastócito, fato esse fundamental para o desencadear do evento anafilactóide. Outros alcaloides, como a curina, a aegolina, a licarisina e a biscoclaurina, também são capazes de proteger os animais desse tipo de reação quando tratados bem como em testes *in vitro* inibem a liberação de histamina ou degranulação de mastócitos por composto 48/80 (GHOSAL et al 1986;ARIBA et al, 1992; RIBEIRO-FILHO, et al., 2014; NUGHORO et al, 2011). A warifteína, um dos alcaloides presentes na planta *Cissampelos sympodialis* assim como a milonina, também foram capazes de levar a sobrevivência aos animais pré-tratados por via oral na dose de 2,0 ou 10mg/kg (COSTA, 2008), corroborando assim o potencial efeito protetor dessa espécie vegetal frente as reações anafilactóides, tendo em vista que dois de seus constituintes isolados apresentam essa característica protetora frente às reações de choque anafilático induzidas por composto 48/80.

Durante a degranulação dos mastócitos, importantes mediadores são liberados, os quais agindo em seus receptores irão causar o sinal clínico de coceira ou *scratching*, como por exemplo: a histamina, serotonina, além do

PAF, PGs e leucotrienos (INAGAKI, et al., 1999; ANDOH et al., 2001). Laboratorialmente, tem se utilizado o composto 48/80 como ferramenta farmacológica para a análise do *scratching behavior* devido ser esse composto conhecido como potente ativador de mastócitos da pele e dos tecidos conjuntivos (BENYON et al., 1989), onde a reação cutânea causada pelo composto 48/80 foi atribuída a ativação de mastócitos e consequente liberação de seus grânulos (METYS et al, 1988).

Em seres humanos, injeção intradérmica de composto 48/80 induz coceira e exsudato protéico (STAHLE e HAGERMARK, 1984; WAHLGREN et al., 1991). Em camundongos, para avaliação da participação desses e outros mediadores no envolvimento desse evento utiliza-se o composto 48/80 para mimetizar a situação experimental proposta.

A dose testada da milonina nessa condição experimental foi 2,0 mg/kg, devido esta ter sido a dose com melhor atividade frente ao choque anafilático induzida pelo composto 48/80. No entanto, na dose não foi observada diminuição significativa do prurido ou *scratching behavior*. Outros alcaloides como a curina e a warifteina reduzem esse evento em doses de 2,5mg/kg e 2,0mg/kg respectivamente (COSTA, 2008; RIBEIRO-FILHO, 2014).

Em estudos realizados por Inagaki, N (2002), onde este examinou o papel do composto 48/80 como indutor do comportamento de prurido, *scratching behavior*, em camundongos BALB / c, avaliando o papel dos mastócitos e seus mediadores, verificou-se que o composto 48/80 pode causar prurido, independente da ação da histamina. Serotonina e mediadores lipídicos como as PGs, PAF e leucotrienos participam desse evento. Ainda foi observado que o composto 48/80 pode induzir prurido em camundongos deficientes em mastócitos, indicando assim que esse composto pode também induzir o prurido por via independente de mastócito (INAGAKI, et al, 2002).

Em estudos como os realizados por Yamamoto, 2010 foi evidenciado que a injeção da morfina também leva ao comportamento de *scratching*, sendo este revertido pelo seu antagonista farmacológico naloxona (YAMAMOTO, A et al., 2010).

Em análises histopatológicas de pele, de animais que foram submetidos ao modelo experimental de *scratching behavior* observou-se tanto padrões inflamatórios gerais, como vasodilatação e migração de células como padrões

diferenciais, a exemplo da presença de um tipo exclusivo de célula, a exemplo do mastócito, evidenciado por corante específico (INAGAKI, et al., 2002).

Nas análises histopatológicas de animais tratados com a milonina observou-se diminuição tanto nos padrões inflamatórios avaliados como nos de migração de célula e, pela coloração com o azul de toluidina, confirmou-se que a célula que estava diminuída no evento inflamatório era mastócito.

Diante disso, sugere-se que a milonina, não atua no comportamento de prurido (*scratching behavior*). Entretanto, leva a diminuição de mastócitos que é evidenciado na análise histopatológica pela menor migração dessa célula e das demais células inflamatórias. Porém o efeito sobre o comportamento de prurido possa estar sendo evidenciado pelo composto 48/80 através de uma via independente da ação de mastócitos como constatado por Inagaki, 2002.

A dor, como um dos sinais cardinais da inflamação, está intimamente relacionada ao processo inflamatório, tanto agudo como crônico, pois os mediadores liberados durante a injúria tecidual são capazes de modificar a transmissão e a excitabilidade de nervos (WOOLF et al,1999). Quanto ao processo de dor inflamatórias, sabe-se que o exsudato, transudato e a liberação de mediadores são os responsáveis por esse processo (LINLEY et al., 2010).

Além disso, altos níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e NO no plasma correlacionam-se com a severidade da dor em pacientes portadores de doenças crônicas (KOCH et al., 2007).

Durante o processo de degranulação dos mastócitos, vários mediadores liberados por essas células são capazes de, agindo em seus receptores, gerar um processo álgico. Entre esses mediadores, se destacam: a histamina, serotonina, enzimas proteolíticas como as quimases, substância P, bradicinina e uma variedade de citocinas, como as ILs-1, 2, 4, 9 e 13 além de mediadores lipídicos como os leucotrienos, como o leucotrieno C4 (CHATTERJE et al. 2015).

A atividade antinociceptiva da milonina foi avaliada por modelos de nocicepção química, como o modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, além de modelos físicos, como o da placa quente.

O teste das contorções abdominais é bastante utilizado na triagem de drogas com possível atividade antinociceptiva (COLLIER, et. al., 1968). Este

método apresenta boa sensibilidade com baixa especificidade, logo substâncias com diferentes mecanismos de ação podem ter bons resultados nesse teste. O efeito nociceptivo desse teste pode ser evitado por drogas como os anti-inflamatórios tanto esteroidais como não esteroidais, além de analgésicos centrais como a morfina (SANTOS, et. al., 2010). Esse teste é descrito como um típico modelo experimental para avaliar a dor de origem inflamatória, pouco específico, mas sensível sendo uma importante ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória (KOSTER *et al.*, 1959; NARAYANAN *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001; BASTOS *et al.*, 2006).

A administração do ácido acético no peritônio provoca comportamentos típicos que são caracterizados por contorções abdominais e redução na coordenação motora. Estes comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral provocada por esse composto. De acordo com Julius e Basbaum, (2001) a excitabilidade neuronal é alterada pela interação direta dos prótons liberados pela dissociação do ácido acético com canais iônicos presentes sobre as terminações nervosas sensoriais. A resposta nociceptiva ao ácido acético presente na cavidade peritoneal de camundongos também resulta na liberação de diversos mediadores inflamatórios como a PGE2 e PGF2 $\alpha$  (DERAEDT *et al.*, 1980). Macrófagos peritoneais liberam as citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8/CXCL8, além de sensibilizar e estimular os neurônios aferentes primários, resultando no aumento da liberação dos neurotransmissores excitatórios tais como o aspartato e o glutamato no fluido cérebro-espinhal (FENG *et al.*, 2003). Os mastócitos também liberam as mesmas citocinas liberadas pelos macrófagos, além de outras como a IL-4, 13, 9 além de diversos mediadores (RIBEIRO, et. al., 2000). O mecanismo nociceptivo decorrente da administração de ácido acético também envolve a participação de receptores vanilóides (IKEDA *et al.*, 2001).

A milonina gerou redução do número de contorções abdominais geradas pelo ácido acético. Esses resultados indicam que a milonina apresenta atividade analgésica central e/ou atividade anti-inflamatória aguda frente a inibição da liberação de mediadores por células residente como os mastócitos peritoneais.

Esses resultados se somam aos de outros alcaloides, como a curina a neferina, a tetandrina e a caulerpina que também reduziram o número de contorções abdominais geradas pelo ácido acético (LEITE, et al. 2013, NAKAJIMA *et al.* 2011; RAHMAN *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2009).

Outro teste utilizado para avaliação da atividade algica, foi o teste da placa quente, sendo este um teste específico para avaliação de substâncias com potencial algico associado a inibição central da dor (ORLANDI, et. al., 2011). A placa aquecida a temperatura constante provoca respostas comportamentais como lambida da pata ou salto do animal (NEMIROVSKY, et. al., 2001). O estímulo térmico provoca ativação dos nociceptores que levam o impulso par ao corno dorsal da medula espinhal e para os centros corticais os quais interpretam o estímulo (DICKENSON; BESSON, 1997).

Embora a milonina seja um alcaloide da classe química morfinamica não foi capaz de aumentar a latência dos animais submetidos ao teste da placa quente nos tempos avaliados diferentemente da morfina que também é um alcaloide morfinamico e que, devido a sua maior solubilidade em membrana hemato encefálica age em nível do SNC aumentando a latência dos animais submetido a essa condição experimental.

Portanto, o conjunto de resultados obtidos nos diferentes testes com a finalidade de avaliar a atividade anti-nociceptiva da milonina indica que sua ação anti-nociceptiva esteja relacionada a nocicepção inflamatória e não central e essa ação está provavelmente relacionada com a inibição da liberação de mediadores por células residentes como macrófagos e mastócitos.

Diante do exposto podemos afirmar que milonina, um alcaloide morfinamico de *Cissampelos sympodialis* apresenta atividade anti-inflamatória e analgésica.

# **CONCLUSÃO**

---

## 6.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo com o alcaloide milonina da planta *Cissampelos sympodialis* EICHL (menispermaceae) em modelos experimentais de inflamação e nocicepção possibilitam concluir que:

A milonina apresentou atividade anti-inflamatória via inibição da desgranulação mastócitos teciduais, porém sem inibir a ação da histamina um dos principais mediadores liberados no processo de degranulação.

A milonina aumentou a sobrevivência de animais submetidos ao modelo experimental de choque anafilático induzido por composto 48/80, sugerindo efeito do alcaloide sobre os mastócitos. Entretanto, em modelo de *scratching behaviour* a milonina não reduziu significativamente o comportamento de coceira mas reduziu o número de mastócitos na pele.

A milonina apresentou atividade anti-nociceptiva via redução da inflamação evidenciada no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético sem alterar a nocicepção central verificada no teste da placa quente.

# ***REFERÊNCIAS***

---

## 7.0 REFERÊNCIAS

ABRAHAM SN, AND ST JOHN AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nat Rev Immunol** v.10, p.440-452. 2010.

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract induces interleukin-10-dependent inhibition of *Trypanosoma cruzi* killing by macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36. p. 199-205, 2003a.

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; PIUVEZAM, M. R.; PECANHA, L. M. Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1511-1522, 2003b.

ALFONSO A, CABADO A G, VIEYTES M R, BOTANA L M. Calcium-pH cross talks in rat mastcells:cytosolic alkalinization,but not intracellular calcium release,is a sufficient signal for degranulation. **J Pharmacol** v.130, p.1809–16. 2000.

ANDOH, T., KATSUBE, N., MARUYAMA, M., KURASHI, Y. Involvement of leukotriene B4 in substance P-induced itch-associated response in mice. **J. Invest. Dermatol.** V.117, p.1621– 1626. 2001.

ANGKASEKWINAI P, PARK H, WANG YH, et al.: Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. **J Exp Med**, v.204, p.1509–1517. 2007.

ARINOBU, Y., IWASAKI, H., GURISH, M.F., MIZUNO, S., SHIGEMATSU, H., OZAWA, H.,TENEN, D.G., AUSTEN, K.F., AKASHI, K. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. **Proc. Natl. Acad.** V. 102, p.18105–18110. 2005.

ARTIS D, HUMPHREYS NE, POTTEN CS, WAGNER N, MULLER W, MCDERMOTT JR, GRENCIS RK, ELSE KJ. Beta 7 integrin deficient mice: delayed leukocyte recruitment and attenuated protective immunity in the small

intestine during enteric helminth infection. **Eur J Immunol** v.30, p.1656-1664. 2000.

AZOUZ N P, ZUR N, EFERGAN A, OHBAYASHI N, FUKUDA M, AMIHAI D. Rab 5 is a novel regulator of mast cell secretory granules: impact on size, cargo, and exocytosis. **J Immunol.** v.192, p.4043–53. 2014.

BACHELET , I., MEKORI ,Y. A. E LEVI-SCHAFFER, F. Mast Cells: Not Only in Allergy, **Immunology and Allergy Clinics of North American**, v.26, p.407-428, 2006

BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, N. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil).**Ciência e Cultura, J Braz AssocAdvSci**, v. 49, p. 386-394, 1997.

BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, V. M. M. et al. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 241-245, 2006.

BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, V. M. M. et al. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 241-245, 2006.

BEGHDADI, W., MADJENE, L.C., BENHAMOU, M., CHARLES, N., GAUTIER, G., LAUNAY P. E BLANK U. Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. **Frontiers in immunology**. V.2 p.1-15, 2011.

BENOIST, C.; MATHIS, D. **Mast cells in autoimmune disease**. Nature, v.420,

BENYON, R.C., ROBINSON, C., CHURCH, M.K. Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. Br. **J. Pharmacol.** V.97, p.898–904. 1989.

BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, p.1152-1160, 2006.

BONNEMAISON M L, EIPPER B A, MAINS R E. Role of adaptor proteins in secretory granule biogenesis and maturation. **Front Endocrin** v.4, p.101.2013

BOYCE MJ. Pharmacological characterisation of cardiovascular histamine receptors in man in vivo. **Wien Klin Wochenschr**. V.60(17), p.978–82. 1982.

BRONNER, C.; WIGGINS, C.; MONTÉ, D.; MÄRKI, F.; CAPRON, A.; LANDRY, Y.;FRANSON R.C. Compound 48/80 is a potent inhibitor of phospholipase C and a dual modulator of phospholipase A2 from human platelet. **Biochimica et**

CASTELLANI ML, KEMPURAJ D, SALINI V, et al.: The latest interleukin: IL-33 the novel IL-1-family member is a potent mast cell activator. **J Biol Regul Homeost Agents**, v.23, p.11–14. 2009.

CAVALCANTE, HORACINNA M.M.; RIBEIRO, THAÍS P; SILVA, DARÍZY F.; NUNES, XIRLEY P. ; BARBOSA-FILHO, JOSÉ M. ; DINIZ, MARGARETH F.F.M. ; CORREIA, NADJA A. ; BRAGA, VALDIR A. ; MEDEIROS, ISAC A. Cardiovascular Effects Elicited by Milonine, a New 8,14 Dihydromorphinandienone Alkaloid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 108, 122–130. 2011.

CHANG, HUI-CHIU; CHANG, FANG-RONG; WU, YANG-CHANG; LAI, YUNG-HSIUNG. Anti-cancer effect of liriodenine on human lung cancer cells. Kaohsiung **J Med Sci** v. 20, n 8. 2004.

CHATTERJEA, D., MARTINOV, T. Mast cells: Versatile gatekeepers of pain **Molecular Immunology** v.63, p. 38–44. 2015.

CHOI, E. Y.; SANTOSO, S.; CHAVAKIS, T. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. **Frontiers Bioscience.**, v. 14, p.1596-605, 2009.

CHRUSCH C, SHARMA S, UNRUH H, et al. Histamine H3 receptor blockade improves cardiac function in canine anaphylaxis. **Am J Respir Crit Care Med.** V.160(4), p.1142–9. 1999.

CHUNG, Y.-M.; CHANG, F.-R.; TSENG, T.-F. et al. A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, p. 1792-1794, 2011.

COHEN SG. PORTIER. Richet and the discovery of anaphylaxis: a centennial.

COLLIER, H.O. DINNER, J.C. JOHNSON, C.A. SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs. **British Journal of pharmacology.** V.32, p. 295-310. 1968.

COLLMANN, E., BOHNACKER, T., MARONE, R., DAWSON, J., REHBERG, M., STRINGER, R., KROM-BACH, F., BURKHART, C., HIRSCH, E., HOLLINGWORTH, G.J., THOMAS, M., WYMAN, M.P. Transient targeting of phosphoinositide 3-kinase acts as a roadblock in mast cells' route to allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.** V.132, p.959–968. 2013.

COOMBS RRA, GELL PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Gell PGH, Coombs RRA, Lachmann PJ, editors. **Clinical aspects of immunology.** 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; p. 761-81. 1975.

CORREIA, M. Dicionario de Plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas. (Dictionary of Brazilian useful plants and exotic cultivated). **Ministerio da Agricultura**; 1984.

CÔRTEZ, S. F. et al. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. **Phytoterapy Research**, v. 9, p. 579-583, 1995.

Costa, H. F, Leite ,F. C., Alves , A. F. , Barbosa-Filho, J. M., Bezerra dos Santos, C. R.,. Piuvezam, M. R. Managing murine food allergy with

Cissampelos sympodialis Eichl (Menispermaceae) and its alkaloids. **International Immunopharmacology** v. 17, p. 300–308. 2013.

COSTA, H. F. et al. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals, **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 519-525, 2008.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R. M. et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **European journal of pharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 161-176, Oct 19 2001.

COUTURE, R.; LINDSEY, C. J. Chapter VII Brain kallikrein–kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: R. QUIRION, A. B. e HÖKFELT, T. (Ed.). **Handbook of Chemical Neuroanatomy**: Elsevier, v. Volume 16, p.241-300. 2000.

DA SILVA, K. A. B. S.; MANJAVACHI, M. N.; PASZCUK, A. F. et al. Plant derived alkaloid (-)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesics effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 967-977, 2012.

DAHLIN, J. S., HALLGREN, J. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. **Molecular Immunology**. V.63 P.9-17, 2005

DAHLIN, J.S., FEINSTEIN, R., CUI, Y., HEYMAN, B., HALLGREN, J., CD11c+ cells are required for antigen-induced increase of mast cells in the lung. **J. Immunol**. V. 189, p.3869–3877. 2012.

DAHLIN, J.S., HEYMAN, B., HALLGREN, J. Committed mast cell progenitors in mouse blood differ in maturity between Th1 and Th2 strains. **Allergy** v.68, p.1333–1337. 2013.

DAKHAMA, A. The role of virus-specific immunoglobulin E in airway hyperresponsiveness. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. V.170, p.952–959. 2004

DARDALHON V, AWASTHI A, KWON H, et al.: IL-4 inhibits TGF-beta induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. **Nat Immunol**, v. 9, p.1347–1355. 2008.

DE LIRA, G. A. et al. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**, v. 73, p.356-358, 2002.

DE PAULIS A, MINOPOLI G, ARBUSTINI E, DE CRESCENZO G, DAL PIAZ F, PUCCI P. Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells. **J Immunol** v.163, p.2799–808.1999.

DE SOUZA, E. T.; DE LIRA, D. P.; DE QUEIROZ, A. C. et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. **Marine drugs**, v. 7, n. 4, p. 689-704, 2009.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F. et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European journal of pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-24, Jan 11 1980.

DICKENSON, A. Mechanism of central hypersensitivity excitatory amino acids mechanism and their control. In: BESSON, M.J.DICKENSON, A. The pharmacology of pain. Springer-Verlag, Berlin, p.21-41. 1997.

DURCHFORT N, VERHOEF S, VAUGHN M B, SHRESTHA R, ADAM D, KAPLAN J. The enlarged lysosomes in beige cells result from decreased lysosome fission and not increased lysosome fusion. **Traffic**. v.13, p.108–19.2012.

EHRlich P Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. (Leipzig University.). 1878.

FANTUZZI, G.; SACCO, S.; GHEZZI, P. et al. Physiological and cytokine responses in IL-1 beta-deficient mice after zymosan-induced inflammation. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 1 Pt 2, p. R400-406, Jul 1997.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 2, p. d12-26, Jan 1 1997.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. D. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**, v. 98, n. 3, p. 729-733, Mar 2003.

FRANCO, C.B., CHEN, C.C., DRUKKER, M., WEISSMAN, I.L., GALLI, S.J. Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level. **Cell Stem Cell** v.6, p.361–368. 2010.

FREITAS, M. R. et al. Modification of calcium metabolism in rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic Action of warifteine, a bisbenzylisoquiniline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.48, p. 335-338, 1996.

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

FUKUDA M, USHIO H, KAWASAKI J, NIYONSABA F, TAKEUCHI M, BABA T, HIRAMATSU K, OKUMURA K, OGAWA H. Expression and functional characterization of retinoic acid-inducible gene-I-like receptors of mast cells in response to viral infection. **J Innate Immun** v.5, p.163-173. 2013

FUKUI H. Review of some molecular and physiological studies of histamine H1 receptor function (Hiroshi Wada Symposium). **Inflamm Res**. V.54(Suppl 1):S, p.52–3. 2005.

GALLI SJ, LANTZ CS. Allergy In: Paul WE. (ed) **Fundamental Immunology**. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1137-84. 1999

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, Feb 5 2010.

GILLESPIE, E.; LEVINE, R.J.; MALAWISTA S.C. Histamine release from rat peritoneal mast cells, inhibition by colchicine and potentiation by deuterium oxide. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**; V. 164,p.163-165, 1968.

GODAI, KOHEI; HASEGAWA-MORIYAMA, MAIKO; TAE KURIMOTO, TAKAYUKI SAITO, TOMOTSUGU YAMADA, TAKAHIRO SATO, MASAYASU KOJIMA, YUICHI KANMURA. Peripheral administration of morphine attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization through COX-2-dependent pathway. **Molecular Pain**, v.10, p.36. 2014.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1248-1257, Nov 2010.

GOMES, J. C.; DI STASI, L. C.; SGARBOSA, F.; BARATA, L.E.S. Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchieta salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig. **Allergy immunology**, v.103, p.1888-193, 1994.

GORINSKY, C.; LUSCOMBE, D. K.; NICHOLLS, P. J. Neuromuscular blocking and local anesthetic activities of warifteine hydrochloridre, an alkaloid isolated from *Cissampelos ovalifolia* D.C.. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 147-148, 1972.

GRAHAM AC, HILMER KM, ZICKOVICH JM, OBAR JJ. Inflammatory response of mast cells during influenza A virus infection is mediated by active infection and RIG-I signaling. **J Immunol** v.190, p.4676-4684. 2013.

GRIMBERG E, PENG Z, HAMMEL I, SAGI-EISENBERG R. Synaptotagmin III is a critical factor for the formation of the perinuclear endocytic recycling compartment and determination of secretory granule size. **J Cell Sci.** v.116, p.145–54. 2003.

GRUND VR, HUNNINGHAKE DB. Inhibition of histamine-stimulated increases in heart rate in man with the H<sub>2</sub>-histamine receptor antagonist cimetidine. **J Clin Pharmacol**;21(2): 87–91. 1981.

GULLIKSSON M, PALMBERG L, NILSSON G, AHLSTEDT S, KUMLIN M. Release of prostaglandin D2 and leukotriene C4 in response to hyperosmolar stimulation of mast cells. **Allergy** v.61, p.1473–9. (2006).

HAMMEL I, LAGUNOFF D, GALLI S J. Regulation of secretory granule size by the precise generation and fusion of unit granules. **J Cell Mol Med** v.14, p.1904–16. 2010.

HARVEY RP, SCHOCKET AL. The effect of H1 and H2 blockade on cutaneous histamine response in man. **J Allergy Clin Immunol**;v.65(2), p.136–9. 1980.

HASHIMOTO, T., OHATA, H., MOMOSE, K. & HONDA, K. Lysophosphatidic acid induces histamine release from mast cells and skin fragments. **Pharmacology.**, v.75, p.13–20, 2005.

HE S, ZHANG H, CHEN H, YANG H, et al.: Expression and release of IL-29 by mast cells and modulation of mast cell behavior by IL-29. **Allergy** (E pub ahead of print). 2010.

HENNINGSSON F, HERGETH S, CORTELIUS R, ABRINK M, PEJLER G .A role for serglycin proteoglycan in granular retention and processing of mast cell secretory granule components. **FEBS J** v.273, p.4901–12. 2006.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S.B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 20, p. 243–249, 1987.

HIKINO, H.; KONNO, C.; TAKATA, H. et al. Antiinflammatory principles of Aconitum roots. **Journal of pharmacobio-dynamics**, v. 3, n. 10, p. 514-525, Oct 1980.

HITOMI K, TAHARA-HANAOKA S, SOMEYA S, et al.: An immunoglobulin-like receptor, Allergin-1, inhibits immunoglobulin E-mediated immediate hypersensitivity reactions. **Nat Immunol**, v.11, p.601–607. 2010.

HOFMANN AM, ABRAHAM SN. New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. **Curr Opin Immunol** v.21, p.679-686. 2009.

HOLMGREN H, WILLANDER O. Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Ehrlichschen Mastzellen. Z. Mikrosk. **Anat. Forsch.** V.42 P.242-278. 1937

HOLOGATE, S.T., ROBINSON, C., CHURCH, M.D. Mediators of immediate hypersensitivity. In: Middleton Jr., E., Reed, C.E., Ellis, E.F., Adkinson, N.F., Yunginger, J.W. (Eds.), **Allergy, Principles and Practice**. Mosby, St. Louis, MO, pp. 267–301. 1988.

IERNA MX, SCALES HE, SAUNDERS KL, LAWRENCE CE. Mast cell production of IL-4 and TNF may be required for protective and pathological responses in gastrointestinal helminth infection. **Mucosal Immunol**, v.1, p.147–155. 2008.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911-2919, Nov 2 2001.

INAGAKI, N., NAKAMURA, N., NAGAO, M., MUSOH, K., KAWASAKI, H., NAGAI, H. Participation of histamine H1 and H2 receptors in passive cutaneous anaphylaxis-induced scratching behavior in ICR mice. **Eur. J. Pharmacol.** V.367, p.361–371. 1999.

INAGAKI,N.,IGETA,K.,KIM,J.F.,NAGAO,M.,SHIRAIISHI,N.,NAKAMURA,N.,NAGAI,H. Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound48/80. **European Journal of Pharmacology** v.448, p.175–183. 2002.

INGERSOLL, M. A. et al. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. **Trends Immunology**, v. 32, p. 470-7, 2011.

IRANI, A. A., SCHECHTER, N. M., CRAIG, S. S., DEBLOIS, G. & SCHWARTZ, L. B. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. **Proc. Natl Acad.** V. 83, p.4464–4468. 1986.

IRANI, A.M., SCHWARTZ, L.B. Human mast cell heterogeneity. **Allergy Proc.** V.15, p.303–308. 1994.

ISHIZAKA K, ISHIZAKA T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. **J Immunol** v.99 p.1187-1198. 1967.

ISHIZAKA K, TOMIOKA H, ISHIZAKA T. Mechanisms of passive sensitization. I. Presence of IgE and IgG molecules on human leukocytes. **J Immunol** v.105 p.1459-1467. 1970.

JONES, B. L.; KEARNS, G. L. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 89, p.189-97, 2011.

JORDAN WJ, ESKDALE J, SRINIVAS S, et al.: Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. **Genes Immun**, v. 8, p.254–261. 2007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, Sep 13 2001.

JUTEL M, WATANABE T, KLUNKER S, et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. **Nature**. V.413(6854), p.420–5. 2001.

KALINER M, SIGLER R, SUMMERS R, SHELHAMER JH. Effects of infused histamine: analysis of the effects of H-1 and H-2 receptor antagonists on cardiovascular and pulmonary responses. **J Allergy Clin Immunol** v.68, p.365-71.1981.

KALINSKI, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2, **J Immunol.**, v. 188, p. 21-8, 2012.

KANAAN, S. A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; HADDAD, J. J. et al. Effects of various analgesic and anti-inflammatory drugs on endotoxin-induced hyperalgesia in rats and mice. **Pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 285-297, Jun 1997.

KATAOKA TR, KUMANOGOH A, BANDARA G, et al.: CD72 negatively regulates KIT-mediated responses in human mast cells. **J Immunol**, v.184, p.2468–2475. 2010.

KEMP,S.F.,LOCKEY,R.F.,.Anaphylaxis:a review of causes and mechanisms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v.110, p.341–348. 2002.

KING CA, ANDERSON R, MARSHALL JS. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. **J Virol** v.76, p.8408-19. 2002.

KOCH, A.; ZACHAROWSKI, K.; BOEHM, O. et al. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p. 32-37, 2007.

KOHNO, T.; WANG, H.; AMAYA, F. et al. Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 17, p. 4533-4540, Apr 23 2008.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBBER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 2, 1959.

KRYSTAL A. D, RICHELSON E E ROTH T. Review of the histamine system and the clinical effects of H1 antagonists: Basis for a new model for understanding the effects of insomnia medications. **Sleep Medicine Reviews** v.17, p. 263-272. 2013.

KULKA M, ALEXOPOULOU L, FLAVELL RA, METCALFE DD. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. **J Allergy Clin Immunol** v.114, p.174-182. 2004

KUPELI, E.; KOSAR, M.; YESILADA, E. et al. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish Berberis species. **Life sciences**, v. 72, n. 6, p. 645-657, Dec 27 2002.

LACY P, STOW J L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood** v.118, p. 9–18. 2011.

LANCASTER JR. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **NitricOxide** v.1, p.18–30. 1997.

LARSEN, J. M.; BONEFELD, C. M.; POULSEN, S. S. et al. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 123, n. 2, p. 486-492, Feb 2009.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The journal of pain: official journal of the American Pain Society**, v. 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B. E.; MUSCARA, M. N. et al. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. **Life sciences**, v. 72, n. 21, p. 2361-2368, Apr 11 2003.

LEAL-BERUMEN I, SNIDER DP, BARAJAS-LOPEZ C, MARSHALL JS. Cholera toxin increases IL-6 synthesis and decreases TNF- $\alpha$  production by rat peritoneal mast cells. **J Immunol**; v.156, p.316–321. 1996.

LEINO L, JUHAKOSKI A, LAUREN L. The determination of histamine in challenged human leukocyte preparations by high-performance liquid chromatography. **Agents Actions**. V.31(3–4), p.178–82. 1990.

LEITE, FAGNER CARVALHO, 2014. Curine, an Alkaloid Isolated from *Chondrodendron platyphyllum* Inhibits Prostaglandin E2 in Experimental Models of Inflammation and Pain. **Planta Medica**; 80:1072–1078. 2014.

LIEBERMAN PL. Specific and idiopathic anaphylaxis: pathophysiology and treatment. In: Bierman CW, Pearlman DS, Shapiro GG, et al, editors. **Allergy, asthma, and immunology from infancy to adulthood**. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders. p. 297-319. 1996.

LIM HD, VAN RIJN RM, LING P, et al. Evaluation of histamine H1-, H2-, and H3-receptor ligands at the human histamine H4 receptor: identification of 4-

methylhistamine as the first potent and selective H4 receptor agonist. **J Pharmacol Exp Ther** v.314(3), p. 1310–21. 2005.

LIMA, THALINE F. A.; ROCHA, JULIANA D. B.; GUIMARÃES-COSTA, ANDERSON B.; BARBOSA-FILHO, JOSÉ M.; DECOTÉ-RICARDO, DÉBORA; SARAIVA, ELVIRA M.; ARRUDA, LUCIANA B.; PIUVEZAM, MARCIA R.; PEÇANHA, LIGIA M. T. Warifteine, an Alkaloid Purified from *Cissampelos sympodialis*, inhibits Neutrophil Migration In Vitro and In Vivo. **Journal of Immunology Research** Volume 2014.

LIN TJ, GARDUNO R, BOUDREAU RT, ISSEKUTZ AC. *Pseudomonas aeruginosa* activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. **J Immunol** 2002;

LIN, T.J., MAHER, L.H., GOMI, K., MCCURDY, J.D., GARDUNO, R., MARSHALL, J.S. Selective early production of CCL20, or macrophage inflammatory protein-3, human mast cells in response to *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Immun.** V.71, p.365–373. 2003.

LINLEY, J. E.; ROSE, K.; OOI, L. et al. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 459, n. 5, p. 657-669, Apr 2010.

LONGROIS D, LEJUS C, CONSTANT I, et al. Treatment of hypersensitivity reactions and anaphylactic shock occurring during anesthesia. **Ann Fr Anesth Reanin.** V.30(3), p.312-22. 2011.

MARINHO, A. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. A validated method for the simultaneous quantitation of bioactive alkaloid markers in the leaf ethanolic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl.: a phenological variation study. **Phytochem Anal.**, v. 23, p.426-32, 2012.

MARSHALL JS. Mast-cell responses to pathogens. **Nat Rev Immunol** v. 4, p.787-799 2004.

MARSHALL, J. S. Mast-cell responses to pathogens, **Nature reviews immunology**, v.4, p. 787-799, 2004.

MARSHALL, J.S., KING, C.A., MCCURDY, J.D. Mast cell cytokine and chemokine responses to bacterial and viral infection. **Curr. Pharma.** V. 8, p.11–24. 2003.

MARTINS ER; CASTRO DM; CASTELLANI DC; DIAS JE. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV. 220p. 1995.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 991-1045, 1994.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, Jul 24 2008.

Melo F R, Waern I, Ronnberg E, Abrink M, Lee D M, Schlenner S M. A role for serglycin proteoglycanin mast cell apoptosis induced by a secretory granule-mediated pathway. **J Biol Chem** v.286, p.5423–33. 2011.

MELO, P. S. et al. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis Eichl*: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**,v.142, p.143-151, 2003.

MERETÉY K, CHIEN HD, FALUS A, et al. Effect of histamine on the T-cell colony formation of PHA-stimulated cells. **Agents Actions.** V.27(1–2), p.215–7. 1989.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. **Mast cells.** Physiology, v.77,

METYS, J., FRYCOVA, H., SOUCEK, R. Inhibition of passive cutaneous anaphylaxis by several histamine H1 and serotonin antagonists in the rat. **Agents Actions** v.23, p.331–333. 1988.

METZ M, SIEBENHAAR F, MAURER M. Mast cell functions in the innate skin immune system. **Immunobiology** v. 213: p. 251-260, 2008.

MIGUEL MD; MIGUEL OG. **Desenvolvimento de fitoterápicos.** São Paulo: Robe Editorial. 115p. 2000.

MILLER J S, WESTIN E H, SCHWARTZ L B. Cloning and characterization of complementary DNA for human tryptase. **J Clin Invest.** V. 84, p.1188–95. 1989.

MINAMI, T.; NAKANO, H.; KOBAYASHI, T. et al. Characterization of EP receptor subtypes responsible for prostaglandin E2-induced pain responses by use of EP1 and EP3 receptor knockout mice. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 3, p. 438-444, Jun 2001.

MINK S, BECKER A, SHARMA S, et al. Role of autocooids in cardiovascular collapse in anaphylactic shock in anaesthetized dogs. **Cardiovasc Res**, v.43(1), p.173–82. 1999.

MIYAMOTO, T.; DUBIN, A. E.; PETRUS, M. J. et al. TRPV1 and TRPA1 Mediate Peripheral Nitric Oxide-Induced Nociception in Mice. **PloS one**, v. 4, n. 10, p.7596, 2009.

MONTELEONE, I.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation. **BMC Medicinal**, 2011 Nov 15;9:122. doi: 10.1186/1741-7015-9-122.

MOON, T. C., BEFUS, A. D. E KULKA, M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. **Frontiers in Immunology** , V.5, n. 569, p. 1-18, 2014.

MORI S, SAINO T, SATOH Y. Effect of low temperatures on compound 48/80-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> changes and exocytosis of rat peritoneal mast cells. **Arch Histol Cytol** v. 63, p.261–70. 2000.

MULLER K, MEINEKE V. Radiation-induced mast cell mediators differentially modulate chemokine release from dermal fibroblasts. **J DermatolSci** v.61, p.199–205. 2011.

NAIDU, P. S.; KINSEY, S. G.; GUO, T. L. et al. Regulation of inflammatory pain by inhibition of fatty acid amide hydrolase. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 334, n. 1, p. 182-190, Jul 2010.

NAKAJIMA, H.; TANAHASHI, T.; YAMADA, J. et al. **PSYCOTHROPIC AGENT AND HEALTH FOOD CONTAINING NEFERINE**. Japan: Institute of Oriental Medical Science Inc. 2011.

NAKAZAWA S, SAKANAKA M, FURUTA K, NATSUHARA M, TAKANO H, TSUCHIYA S. Histamine synthesis required for granule maturation in murine mast cells. **Eur J Immunol** v.44, p.204–14.2014.

NARAYANAN, N.; THIRUGNANASAMBANTHAM, P.; VISWANATHAN, S. et al. Antipyretic, antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Premna herbacea* roots. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 147-153, 2000.

NEMIROVSKY, A., CHAN, L., ZELMAN, V., JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinalmorphine with systemic morphine or bupremorphine. **Anestesia & Analgesia**. V.93, p. 197-203. 2011.

NIEMEGEREERS, C. J.; AWOUTERS, F.; NUETEN, V.; DE NOLLIN, S.; JANSSEN, P.A. Protection of rats from compound 48/80-induced lethality. A simple test for inhibitors of mast cell-mediated shock. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de therapie*, v.234, p.164-176, 1978.

NIRAJ, M. M. GUPTA E SHWETA PANDEY. Histamine Biosensor: A Review. **Ijpsr**, V. 3(11), P. 4158-4168. 2012.

NUGRAHO, A. E., RIYANTO, S., SUKARI, M.A., MALYANE, K. Effects of aegeline, a main alkaloid of eagle marmelos correa leaves, on the histamine release from mast cells. *Park. J. Pharm. Sci.* v. 24, p 259-367. 2011.

OLSZEWSKI M B, GROOT A J, DASTYCH J, KNOL E F. TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. **J Immunol** v.178, p.5701–9. 2007.

ORLANDI, L., VILELA, F.C., SANTOS-CECÍLIA F.V. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *byrsonima intermedia* A Juss. **Journal of ethnopharmacology**. V.197, p.1469-1476. 2011.

PALOMAKI, V.A.B.; LAITINEN, J.T. The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat brain sections. **British Journal of Pharmacology**, v.147, p.596–606, 2006.

PARK, H.J., CHA, D. S., JEOH, H. Antinociceptive and hypinotic properties of *Celastrus orbicularis*. *Journal of ethnopharmacology*. V. 137, p.1240/1244. 2011.

PARMENTIER R, OHTSU H, DJEBBARA-HANNAS Z, et al. Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control. **J Neurosci**. V.22(17), p.7695–711. 2002.

PATON, W.D.M. Compound 48/80: A potent histamine liberator. **British Journal of Pharmacology**. v.6, p.499-508, 1951.

PEJLER, G., KNIGHT, S.D., HENNIGSON, F., WERNERSSON, S. Novel insights into the biological function of mast cell carboxypeptidase A. **Trends Immunol**. V.30, p.401–408. 2009.

PIUVEZAM, M. R. et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A- treated BALB/c spleen cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 93-101, 1999.

PORTH, C. M. **Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States**. 3. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. 1280

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F. et al. 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. 331-338, May 2004.

PRASAD P, YANAGIHARA A A, SMALL-HOWARD A L, TURNER H, STOKES A J. Secretogranin III directs secretory vesicle biogenesis in mast cell sinamanner dependent upon interaction with chromogranin A. **J Immunol** v.181, p.5024–34. 2008.

RABENHORST A, SCHLAAK M, HEUKAMP LC, FÖRSTER A, THEURICH S, BERGWELT-BAILDON M VON, BÜTTNER R, KURSCHAT P, MAUCH C, ROERS A, HARTMANN K. Mast cells play a protumorigenic role in primary cutaneous lymphoma. **Blood**, v.120, p.2042-54. 2012.

RAHMAN, M. H.; ALAM, M. B.; HOSSAIN, M. S. et al. Antioxidant, Analgesic and Toxic Potentiality of Methanolic Extract of *Stephania Japonica* (Thunb.) Miers. Leaf. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 5, 2011.

RIBEIRO, R.A. VALE, M.L., THOMAZZI, S.M. et al., Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of pharmacology**. V.194, p.111-118. 2000.

RIBEIRO-FILHO, J., LEITE, F. C., COSTA, H. F., CALHEIROS, A. S., TORRES, R. C., AZEVEDO, C. T, MARTINS, M. A., DIAS, C. DA S., BOZZA, P. T., PIUVEZAM, M. R. Curine inhibits mast cell-dependent responses in mice. **Journal of Ethnopharmacology** v.155, p.1118–1124. 2014.

RILEY JF, WEST GB. Histamine in tissue mast cells. **J Physiol** v.117 p. 72-73 1952.

ROBBINS & COTTRAN. **Patologia básica**. Elsevier. 2013.

ROCHA E SILVA M, SCROGGIE A E, FIDLAR E AND JACQUES LB. Liberation of histamine and heparin by peptone from isolated dog's liver. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** V.64 p.141-146. 1947.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. 1978. **Agents and actions**, v. 43, n. 3-4, p. 86-90, Dec 1994.

ROCHA, J. D. et al. Inhibitory effect of the alkaloid warifteine purified from *Cissampelos sympodialis* on B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Planta Med.**, v. 76, p.325-30, 2010.

SAMPSON HA, MUNOZ-FURLONG A, CAMPBELL RL, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report-

second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. **Ann Emerg Med.** V.47(4), p.373-80. 2006.

SANDER, L. E. *et al.* Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. **Eur. J. Immunol.** V.38, p.855–863 2008.

SANTOS MRA; LIMA MR; FERREIRA MGR. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura Brasileira** v.26, p. 244-250. 2008.

SANTOS, D.A. FUKUI MDE, J. DHANNIKO, *et. al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *bacharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of ethnopharmacology.** V. 127, p.543-550, 2010.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual review of biomedical engineering,** v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHMITZ J, OWYANG A, OLDHAM E, *et al.*: IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity,** v.23, p.479–490. 2005.

SCHWARTZ L B, LEWIS R A, SELDIN D, AUSTEN K F. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. **J Immunol.** V.126, p.1290–4. 1981.

SCHWARTZ LB, IRANI AM, ROLLER K, *et al.* Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. **J Immunol.** V.138, p.2611–5. 1987.

SCOTT, E.W., SIMON, M.C., ANASTASI, J., SINGH, H. Requirement of transcriptionfactor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. **Science** v.265, p.1573–1577. 1994.

SCRIVO , R, . VASILE, M, BARTOSIEWICZ, I., VALESINI, G. Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. **Autoimmunity Reviews** 10 369–374. 2011.

SELL S. RICH RR, FLEISHER TA, SCHWARTZ BD, SHEARER WT, STROBER W. Clinical immunology: principles and practice. St Louis: Mosby; **Immunopathology**. p. 449-77. 1996.

SEOW, W. K.; FERRANTE, A.; GOH, D. B. et al. In vitro immunosuppressive properties of the plant alkaloid tetrandrine. **International archives of allergy and applied immunology**, v. 85, n. 4, p. 410-415, 1988.

SHEA-DONOHUE T, . STILTZ, J., ZHAO A., E NOTARI, L. Mast cell. **Curr Gastroenterol Rep**. V.12, p.3,49-357, 2010.

SHERWIN, C. M.; CHRISTIANSEN, I. J.; DUNCAN, H. W. E.; LAY, D. C.; MENCH, J. A.; O’CONNOR, C. E.; PETHERIC, J. C. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. **Appl Anim Behav Sci**, v. 8, p. 291-305, 2003.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 85-405, 2004.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 5. ed., Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SMITH PL, KAGEY-SOBOTKA A, BLEECKER ER, et al. Physiologic manifestations of human anaphylaxis. **J Clin Invest**, v.66, p.1072-80. 1980.

STAHL, M., HAGERMARK, O. Effects of topically applied clobetasol-17-propionate on histamine release in human skin. **Acta Derm.-Venereol**. V.64, p.239– 242. 1984.

STRIK M C, DE KONING P J, KLEIJMEER M J, BLADERGROEN B A, WOLBINK A M, GRIFFITH J M. Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. **Mol Immunol.** v.44, p.3462–72. 2007.

SUDHAKARAN, P. R.; RADHIKA, A.; JACOB, S. S. Monocyte macrophage differentiation in vitro: Fibronectin-dependent upregulation of certain macrophage-specific activities. **Glycoconjugate journal**, v. 24, n. 1, p. 49-55, 2007.

TALLO, F. S., GRAFF, S., VENDRAME, L. S., LOPES R. D., LOPES, A. C. Anafilaxia: reconhecimento e abordagem. Uma revisão para o clínico. **Rev Bras Clin Med.** v.10(4), p. 329-33. 2012.

TATEMOTO,K.,NOZAKI,Y.,TSUDA,R.,KONNO,S.,TOMURA,K.,FURUNO,M.,O GASAWARA,H,EDAMURA,TAKAGI,H.,IWAMURA,H.,NOGUCHI,M.,NAITO,T. Immunoglobulin E independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.349, p.1322–1328. 2006.

TEH, B. S.; SEOW, W. K.; LI, S. Y. et al. Inhibition of prostaglandin and leukotriene generation by the plant alkaloids tetrandrine and berbamine. **International journal of immunopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 321-326, 1990.

THOMAS, G. et al. Bronchodilatory activity of in aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) in the guinea-pig. **Phytomedicine**, v.4, p. 233-238, 1997.

THOMAS, G. et al. Characterization of the extract from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) on spontaneous tone of isolated trachea, cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and intracellular cAMP. **Phytoterapy Research**, v. 11, p. 496-499, 1997b.

THOMAS, G. et al. Preliminary studies on the hydroalcoholic extract of the root of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in guinea-pig tracheal strips and bronchoalveolar leucocytes. **Phytother. Res.**, v. 9, p. 473-477, 1995.

THURMOND RL, DESAI PJ, DUNFORD PJ, et al. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. **J Pharmacol Exp Ther**; v.309, p.404–13. 2004.

TIWARI,N., WANG,C.C.,BROCHETTA, C., KE, G., VITA, F., RIVERA, J., SORANZO, M. R., ZABUCCHI, G., HONG, W., AND BLANK, U. VAMP-8 segregates mast cell pre- formed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. **Blood** v.111, p.3665–3674. 2008.

UVNAS B. Recent observation son mechanisms of storage and release of mast cell histamine. Applicability to other biogenic amines. **Agents Actions Suppl** v.36, p.23–33.1992.

VARGA C, HORVATH K, BERKO A, et al. Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat. **Eur J Pharmacol**, v.522(1–3), p.130–8. 2005.

VESTWEBER D., How the leucocytes cross the vascular endothelium. **Nature review immunology**, v. 15, p. 692-704, 2015

VIEIRA, G. C, DE LIMA J. F., DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q., MASCARENHAS, S. R., BEZERRA-SANTOS, C. R. E PIUVEZAM, M. R. Inhaled Cissampelos sympodialis Down-Regulates Airway Allergic Reaction by Reducing Lung CD3+T Cells. **Phytother. Res.** V.27, p. 916–925. 2013.

VLIAGOFTIS, H., BEFUS, A.D. Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. **Immunol. Rev.** 206, 190–203. 2005a

VOSSKUHL K, GRETEN TF, MANNS MP, et al.: Lipopolysaccharidemediated mast cell activation induces IFN-gamma secretion by NK cells. **J Immunol**, v. 185, p.19–125. 2010.

WAHLGREN, C.F. Itch and atopic dermatitis: clinical and experimental studies. **Acta Derm.-Venereol.**, Suppl. 165, 1– 53. 1991.

WANG, D.; ZHU, J.; WANG, S. et al. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from *Bulbus Fritillariae Cirrhosae*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1290-1294, 2011.

WEDEMEYER, J., M. TSAI, AND S. J. GALLI.. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. **Curr. Opin. Immunol.** V.12 p.624–631. 2000.

WENERSSON S E PEJLER G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nature reviews immunology.** V.14 p.478-494, 2014.

WERNERSSON S, PEJLER G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nat Rev Immunol.** v.14, p.478–94. 2014.

WILSON S J, SHUTE J K, HOLGATE S T, HOWARTH P H, BRADDING P. Localization of interleukin(IL)-4 but not IL-5 to human mast cell secretory granules by immune electron microscopy. **Clin Exp Allergy.** v.30, p.493–500. 2000.

WONG, C. W.; SEOW, W. K.; O'CALLAGHAN, J. W. et al. Comparative effects of tetrandrine and berbamine on subcutaneous air pouch inflammation induced by interleukin-1, tumour necrosis factor and platelet-activating factor. **Agents and actions**, v. 36, n. 1-2, p. 112-118, May 1992.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 7723-7730, Jul 6 1999.

YAMAMOTO T, NAZAKI-TAGACCHI, N, CHIBA, T. Analgesic effect of intrathecally administered tereodoxin A in the rat hot plate test. **British journal pharmacology.** V. 137, p. 170-176. 2002.

YAMAMOTO, A., KUYAMA, S., . KAMEI, C , SUGIMOTO Y. Characterization of scratching behavior induced by intradermal administration of morphine and fentanyl in mice. **European Journal of Pharmacology** v.627, p. 162–166. 2010.

ZHU, F.G. & J.S. MARSHALL. CpG-containing oligodeoxynucleotides induce TNF-alpha and IL-6 production but not degranulation from murine bone marrow-derived mast cells. **J. Leukoc. Biol.** v. 69, p. 253–262. 2001.

ZOU, Y., DONG, C., YUAN, M., GAO, G., WANG, S., LIU, X., HAN, H. e LI, BO. Instilled air promotes lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Experimental and therapeutic medicine** v.7, p.816-820. 2014.

***ANEXOS***

---